

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Bacillus* spp. COMO MICROORGANISMOS
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) EN BRÓCOLI
(*Brassica oleracea*) Y LECHUGA (*Lactuca sativa*)**

AUTORAS:

**MAMARANDI MOSSOT JOHANNA ESTEFANIA
OJEDA SHAGÑAY ANDREA GIOMAYRA**

TUTOR:

RAMIRO DANIEL ACURIO VÁSCONEZ

Quito, mayo del 2019

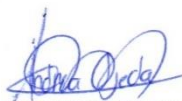
Cesión de derechos de autor

Nosotros, Mamarandi Mossot Johanna Estefania con documento de identificación N° 1723292817 y Ojeda Shagñay Andrea Giomayra con documento de identificación N°1727063511, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación intitulado: "EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Bacillus* spp. COMO MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) EN BRÓCOLI (*Brassica oleracea*) Y LECHUGA (*Lactuca sativa*)", mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Mamarandi Mossot Johanna Estefania
1723292817



.....
Ojeda Shagñay Andrea Giomayra
1727063511

Quito, mayo del 2019

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “EVALUACIÓN DE CEPAS DE *Bacillus* spp. COMO MICROORGANISMOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR) EN BRÓCOLI (*Brassica oleracea*) Y LECHUGA (*Lactuca sativa*)” realizado por Mamarandi Mossot Johanna Estefania y Ojeda Shagñay Andrea Giomayra, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, mayo del 2019

(f).....

Ing. Ramiro Daniel Acurio Vásquez MSc.

C.I: 1714819495

Dedicatoria

A Dios.

A mis padres Luis y Sayra por su apoyo incondicional.

A mis hermanas y sobrina por sus ocurrencias y cariño único.

A Andres por su amor, confianza y motivación.

A toda mi familia y amigos.

Johanna Estefania Mamarandi Mossot

A Dios.

A mi madre María del Carmen por su apoyo incondicional y su amor inmenso.

A mi hermano David por su amor, su paciencia y apoyo.

A mis primos y tíos por su cariño y por estar siempre a mi lado.

Andrea Giomayra Ojeda Shagñay

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por inculcarnos valores y conocimientos que nos permiten ser profesionales de buen nivel.

A nuestro tutor MSc. Daniel Acurio por habernos brindado la oportunidad de formar parte de su proyecto, por su paciencia y por habernos guiado con sus conocimientos durante el desarrollo de la investigación.

A la familia Acurio Vásconez por su hospitalidad y buena voluntad.

Al Centro de Investigación y Valoración de Biodiversidad y sus ayudantes por su apoyo durante las actividades del presente proyecto.

Índice de Contenido

Capítulo 1	3
1. Marco Teórico	3
1.1 Consideraciones generales del cultivo de lechuga	3
1.1.1 Origen	3
1.1.2 La lechuga en Ecuador	3
1.1.3 Taxonomía	3
1.1.4 Características	4
1.1.5 Cultivo	4
1.1.6 Variedad Coolguard	5
1.2 Consideraciones generales del cultivo de brócoli	5
1.2.1 Origen	5
1.2.2 El brócoli en Ecuador	6
1.2.3 Taxonomía	6
1.2.4 Características	6
1.2.5 Cultivo	7
1.2.6 Variedad avenger	7
1.3 El género <i>Bacillus</i>	8
1.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	9
1.3.2 <i>Bacillus licheniformis</i>	9
1.3.3 <i>Bacillus megaterium</i>	10

1.4	Microorganismos promotores del crecimiento (PGPR)	10
1.4.1	Mecanismos de acción	12
1.5	Producción de auxinas	12
1.5.1	Auxinas	12
1.5.2	Bacterias productoras de AIA	13
1.5.3	Ruta de síntesis de AIA	14
1.6	Fijación biológica de nitrógeno (FBN)	15
1.6.1	Nitrógeno	15
1.6.2	Bacterias fijadoras de nitrógeno	15
1.6.3	Mecanismo de fijación de nitrógeno	16
1.7	Solubilización de fosfatos	16
1.7.1	Fósforo	16
1.7.2	Bacterias solubilizadoras de fosfatos	17
1.7.3	Mecanismos para la solubilización de fosfatos	17
1.8	Medio NFB para la fijación de nitrógeno atmosférico	19
1.9	Método colorimétrico de Salkowski para la cuantificación de AIA	19
1.10	Medio Pikovskaya para la solubilización de fosfatos	20
1.11	Método colorimétrico de Mo-Blue para la cuantificación de fosfatos	20
1.12	Eficiencia fotosintética	20
1.13	Diseño completamente al azar (DCA)	21
1.14	Prueba POST HOC Tukey	21
1.15	Área bajo la curva (ABC)	22

Capítulo 2	23
2. Metodología	23
2.1 Fase de laboratorio	23
2.1.1 Fijación de nitrógeno atmosférico	23
2.1.1.1 Reactivación de cepas de <i>Bacillus</i> spp. y siembra en medio NFB....	23
2.1.2 Análisis cualitativo de la producción de AIA	24
2.1.2.1 Reactivación de cepas de <i>Bacillus</i> spp. y siembra en medio TSB	24
2.1.2.2 Preparación del reactivo Salkwoyky y detección de auxinas	24
2.1.3 Análisis cuantitativo de la producción de AIA	24
2.1.3.1 Curva de calibración y espectrofotometría	24
2.1.4 Análisis cualitativo de la solubilización de fosfatos	25
2.1.4.1 Reactivación de cepas y siembra en medio Pikovskaya	25
2.1.5 Índice de solubilización de fosfatos	26
2.1.6 Análisis cuantitativo de la solubilización de fosfatos	26
2.1.6.1 Reactivación de cepas de <i>Bacillus</i> spp. y siembra en medio NBRIP	26
2.1.6.2 Preparación del reactivo Mo-blue	26
2.1.6.3 Curva de calibración y espectrofotometría	27
2.2 Fase de campo	28
2.2.1 Diseño en campo	28
2.2.2 Diseño experimental	29
2.2.3 Preparación del inóculo bacteriano	29
2.2.4 Siembra de semillas	30

2.2.5	Tratamientos.....	30
2.2.6	Área bajo la curva (ABC)	31
2.2.7	Variables y métodos de evaluación.....	31
2.2.7.1	Porcentaje de germinación	31
2.2.7.2	Altura de la planta	32
2.2.7.3	Grosor del tallo	32
2.2.7.4	Eficiencia fotosintética	32
2.2.7.5	Materia verde de la parte aérea.....	32
2.2.7.6	Materia seca de la parte aérea.....	33
2.2.7.7	Longitud y peso de la raíz	33
Capítulo 3	34
3. Resultados y discusión	34
3.1	Fase de laboratorio	34
3.1.1	Fijación de nitrógeno atmosférico	34
3.1.2	Producción de ácido indolacético	36
3.1.2.1	Cuantificación de ácido indolacético	37
3.1.3	Solubilización de fosfatos	40
3.1.3.1	Índice de solubilización	40
3.1.3.2	Cuantificación de fosfatos solubilizados.....	43
3.2	Fase de campo	45
3.2.1	Especie lechuga.....	46
3.2.1.1	Altura.....	46

3.2.1.2	Grosor del tallo	46
3.2.1.3	Porcentaje de germinación	47
3.2.1.4	Eficiencia fotosintética (Fv/m)	47
3.2.1.5	Materia seca.....	48
3.2.1.6	Longitud de la raíz.....	49
3.2.1.7	Peso de la raíz	50
3.2.2	Especie brócoli	51
3.2.2.1	Altura.....	51
3.2.2.2	Grosor del tallo	52
3.2.2.3	Porcentaje de germinación	53
3.2.2.4	Eficiencia fotosintética (Fv/m)	53
3.2.2.5	Materia seca.....	53
3.2.2.6	Longitud de la raíz.....	54
3.2.2.7	Peso de la raíz	55
Conclusiones		60
Recomendaciones		61
Referencias.....		62
Anexos		74

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de lechuga.....	4
Tabla 2. Clasificación taxonómica de brócoli.....	6
Tabla 3. Codificación de las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	23
Tabla 4. Curva de calibración de AIA	255
Tabla 5. Curva de calibración de fosfatos	27
Tabla 6. Características geográficas y ambientales de la localización del ensayo....	28
Tabla 7. Esquema ANOVA.....	29
Tabla 8. Descripción de los tratamientos aplicados en campo.....	30
Tabla 9. Fijación de nitrógeno atmosférico por las cepas de <i>Bacillus</i> spp	34
Tabla 10. Producción de AIA por las cepas de <i>Bacillus</i> spp	36
Tabla 11. Absorbancias para la curva de calibración de AIA.....	37
Tabla 12. Concentración de AIA producido por las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	39
Tabla 13. Diámetro de la colonia y halo de solubilización a las 24 y 48 horas en medio Pikovskaya (mm).....	41
Tabla 14. Absorbancias para la curva de calibración de fosfatos	43
Tabla 15. Concentración de fosfatos solubilizados por las cepas de <i>Bacillus</i> spp.....	45
Tabla 16. Análisis de varianza para el ABC de altura, prueba Tukey al 5 %	46
Tabla 17. Análisis de varianza para el porcentaje de germinación, prueba Tukey al 5 %.....	47
Tabla 18. Análisis de varianza para la eficiencia fotosintética Fv/m, prueba Tukey aj 5 %.....	48

Tabla 19. Análisis de varianza para la materia seca, prueba Tukey al 5 %	49
Tabla 20. Análisis de varianza para la longitud de la raíz, prueba Tukey al 5 %	50
Tabla 21. Análisis de varianza para el peso de la raíz, prueba Tukey al 5 %	51
Tabla 22. Análisis de varianza para el ABC de altura, prueba Tukey al 5 %	52
Tabla 23. Análisis de varianza para el ABC del grosor del tallo, prueba Tukey al 5 %.....	53
Tabla 24. Análisis de varianza para la materia seca, prueba Tukey al 5 %	54
Tabla 25. Análisis de varianza para la longitud de la raíz, prueba Tukey al 5 %	55
Tabla 26. Análisis de varianza para el peso de la raíz, prueba Tukey al 5 %	56

Índice de Figuras

Figura 1. Estructa química del AIA	13
Figura 2. Ruta de síntesis de AIA	14
Figura 3. Gráfica de los datos de un tratamiento en un tiempo determinado para cálculo del ABC.....	22
Figura 4. Fijación biológica de nitrógeno por las cepas de <i>Bacillus</i> spp.	35
Figura 5. Producción de AIA por las cepas de <i>Bacillus</i> spp	37
Figura 6. Curva de calibración de AIA a 530 nm	38
Figura 7. a) halo de solubilización a las 24 horas, b) halo de solubilización a las 48 horas	40
Figura 8. Comparación de los índices de solubilización a las 24 y 48 horas de incubación.	42
Figura 9. a) índice de solubilización a las 24 horas b) índice de solubilización a las 48 horas, Tukey al 5 %	402
Figura 10. Curva de calibración de fosfato a 880 nm	44

Índice de Anexos

Anexo 1. Medios de cultivo	74
Anexo 2. Tablas ANOVA fase de laboratorio.....	76
Anexo 3. Tablas ANOVA fase de campo, especie lechuga	78
Anexo 4. Tablas ANOVA fase de campo, especie brócoli	811
Anexo 5. Fase de laboratorio.....	84
Anexo 6. Fase de campo.....	85

Resumen

La promoción del crecimiento vegetal por PGPR ocurre de dos formas, la primera es la síntesis de sustancias reguladoras de crecimiento, como giberelinas y auxinas, la fijación de nitrógeno atmosférico y la solubilización de fosfatos y la segunda es mediante el control biológico de patógenos. Varias cepas de *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* y *B. pumilus* han destacado en las características antes nombradas.

Mediante pruebas de laboratorio se comprobó que las cepas de *Bacillus licheniformis* (BL) y *Bacillus megaterium* (CT11) tienen la capacidad de fijar de nitrógeno, producir auxinas en concentraciones de $11,4050 \pm 0,0879$ y $8,9040 \pm 0,4550$ ppm respectivamente y solubilizar fosfatos en concentraciones de $41,7501 \pm 1,7302$ y $43.2257 \pm 0,0799$ ppm respectivamente. La evaluación en campo se realizó mediante un diseño experimental DCA en piloneras de brócoli y lechuga. En lechuga se obtuvo un 26,7 % más de altura comparado con el testigo con el tratamiento 2, los tratamientos 2 y 4 aumentaron el porcentaje de germinación, el tratamiento 3 influyó positivamente en las condiciones del fotosistema II, y el tratamiento 4 incrementó el contenido de materia seca. Para brócoli se obtuvo un 13,72 % más de altura en comparación con el testigo con el tratamiento 2 y el tratamiento 2 incrementó el contenido de materia seca. El peso y longitud de la raíz aumentó significativamente en comparación con el testigo en los tratamientos para las dos especies hortícolas.

Palabras clave: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, PGPR.

Abstract

The promotion of plant growth by PGPR occurs in two ways, the first is the synthesis of growth regulating substances, such as gibberellins and auxins, the fixation of atmospheric nitrogen and the solubilization of phosphates and the second is through the biological control of pathogens. Several strains of *Bacillus*, such as *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* and *B. pumilus*, have stood out in the aforementioned characteristics.

Through laboratory tests it was proved that strains of *Bacillus licheniformis* (BL) and *Bacillus megaterium* (CT11) have the capacity to fix nitrogen, produce auxins at concentrations of 11.4050 ± 0.0879 and 8.9040 ± 0.4550 ppm respectively and solubilize phosphates in concentrations of 41.7501 ± 1.7302 and 43.2257 ± 0.0799 ppm respectively. The field evaluation was carried out by means of an experimental DCA design in broccoli and lettuce pylons. In lettuce, 26.7 % more height was obtained compared to the control with treatment 2, treatments 2 and 4 increased the percentage of germination, treatment 3 positively influenced the conditions of photosystem II, and treatment 4 increased the dry matter content. For broccoli, 13.72 % more height was obtained compared to the control with treatment 2 and treatment 2 increased the dry matter content. The weight and length of the root increased significantly compared to the control in the treatments for the two horticultural species.

Key words: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, PGPR.

Introducción

El uso indiscriminado de fertilizantes comerciales de naturaleza química ha ocasionado una alteración en el equilibrio de la microbiota nativa de los suelos, ya que al no ser consumidos al 100 % se bioacumulan causando contaminación de aguas subterráneas, alteración del pH, peligros a la salud humana y en casos extremos convierten al suelo en un simple sustrato. Sin embargo estos fertilizantes son necesarios ya que aportan nutrientes que permiten el desarrollo de las plantas, pero su uso representa del 20 al 30 % de los costos de producción de un cultivo agrícola (León, 2014).

Actualmente, se ha establecido una nueva estrategia que permite la disminución del uso de fertilizantes químicos, esta se basa en el uso de microorganismos que colonizan la rizósfera y participan activamente en la captación de nutrientes y en la mineralización de la materia orgánica, promoviendo el crecimiento de las plantas e incrementando la absorción y disponibilidad de nutrientes del suelo (Martínez, Peniche, Iturriaga, Medrano, & Pacheco, 2013).

Diversas investigaciones proponen que bacterias del género *Bacillus* spp. actúan como promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) mediante mecanismos que facilitan a las plantas su desarrollo, como la producción de antibióticos y enzimas, la solubilización de fosfatos, la producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal y la fijación biológica del nitrógeno (Zuñiga, 2009).

Tejera, Rojas, & Heydrich (2011), afirman que la promoción del crecimiento vegetal por parte de las especies del género *Bacillus* se da de forma directa o indirecta, entre los efectos directos se encuentran la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización

de fósforo y la producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal, mientras que la forma indirecta es la producción de sustancias antagonistas de patógenos.

En la investigación realizada por Collaguazo & Tenorio (2018), se demostró la capacidad de *Bacillus* sp. para el control del hongo fitopatógeno *Alternaria* spp. en cultivos de brócoli, siendo este un mecanismo indirecto para la promoción de crecimiento vegetal.

Por lo nombrado anteriormente la presente investigación tiene como finalidad evaluar la capacidad de *Bacillus* spp., como microorganismo promotor del crecimiento vegetal en hortalizas, para de esta manera aplicar recursos de la biotecnología en el desarrollo de una agricultura amigable con el medio ambiente y como alternativa de reducción al uso de fertilizantes químicos.

Mediante las pruebas de laboratorio se evaluó la capacidad de fijación biológica de nitrógeno mediante un análisis cualitativo en medio de cultivo libre de nitrógeno, la producción de ácido indolacético se realizó en medio TSB y se cuantificó la concentración con el reactivo Salkowsky, la solubilización de fosfatos se realizó en medio NBRIP y se cuantificó la concentración de fósforo transformado con el reactivo Mo-Blue. Las dos mejores cepas fueron evaluadas en pruebas de invernadero y se midieron las siguientes variables: longitud de la planta, diámetro del tallo, longitud y peso de la raíz, materia seca y eficiencia fotosintética.

Capítulo 1

1. Marco Teórico

1.1 Consideraciones generales del cultivo de lechuga

1.1.1 Origen

Su origen no está del todo claro, sin embargo Simbaña (2015), afirma que la lechuga es originaria de la costa sur y sur este del mar Mediterráneo, fue introducida a América por los primeros exploradores y cultivada inicialmente en el área del Caribe. Se cree que las lechugas cultivadas actualmente se derivaron de *Lactuca serriola*, que mediante hibridaciones entre especies y resultado del proceso evolutivo dieron origen a la lechuga actual.

1.1.2 La lechuga en Ecuador

Tomando en cuenta que el cultivo de lechuga está considerado como uno de los más importantes del grupo de las hortalizas de hoja, se conoce que en Ecuador hay 1145 ha de lechuga con un rendimiento promedio de 7928 kg por ha; de la producción total, el 70 % es de lechuga criolla, mientras el 30 % es de variedades como la roja, la roma o la salad. Las provincias con mayor producción bajo invernadero son: Cotopaxi con 481 ha, Tungurahua con 325 ha y Carchi con 96 ha (López, 2017).

1.1.3 Taxonomía

Según Delgado (2016), la lechuga tiene la taxonomía descrita en la Tabla 1.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de lechuga.

Reino	Plantae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Cichorioideae
Género	<i>Lactuca</i>
Especie	<i>sativa</i>
Nombre científico	<i>Lactuca sativa</i> L.

Elaborado por: las autoras, 2019.

1.1.4 Características

La lechuga es una planta anual autógama que se desarrolla en climas templados, con temperaturas que oscilan entre 13 y 18 °C, requiere precipitaciones entre los 1200 a 1500 mm anuales (Guato, 2015).

Según Guato (2015) presentan las siguientes características morfológicas: son más o menos redondas, su diámetro varía de 20 a 30 cm y su peso medio es de 300 g; la raíz no supera los 30 cm de profundidad, es pivotante, corta y con ramificaciones; las hojas están colocadas en roseta y algunas se despliegan al principio; el borde de los limbos es liso, ondulado o aserrado; su tallo es cilíndrico y ramificado de fácil regeneración que soporta el trasplante; su inflorescencia tiene capítulos florales amarillos dispuestos en racimos y sus semillas están provistas de un vilano plumoso.

1.1.5 Cultivo

Por lo general, la multiplicación de lechuga se realiza con plántulas obtenidas de semilleros, el porcentaje de germinación por este método varía según la especie, pero usualmente alcanza un 92 % de germinación (Guato, 2015).

La siembra se realiza en pilones, colocando una sola semilla por alveolo a 5 cm de profundidad, las semillas germinan entre los 15 a 20 días dependiendo del tipo de sustrato, al cabo de 30 a 40 días después de la siembra, cuando la plántula tenga de 5 a 6 hojas verdaderas y alcance los 8 cm de altura se la trasplanta a suelo ligeros, arenosos-limosos, con buen drenaje y con un pH entre 6,7 - 7,4 (Cazorla, 2010).

Cuando el cultivo se realiza mediante la modalidad de semillero/trasplante se rompe la dominancia de la raíz principal, por lo que las raíces adventicias se regeneran fácilmente, generando un sistema radicular más ramificado y superficial (Cazorla, 2010).

1.1.6 Variedad Coolguard

Esta variedad es muy uniforme y de alto vigor por lo que se adapta a varios climas especialmente a climas fríos. Su periodo desde el trasplante a la cosecha dura de 80 a 85 días, presenta un rendimiento medio que puede oscilar entre las 20 y 40 t/ha dependiendo de los tipos varietales y los marcos de plantación (Guamán, 2017).

Las cabezas son redondas y firmes, de color verde oscuro y hojas envolventes grandes con muy buena cobertura, alta calidad y sabor; alcanzan un peso promedio de 800 g a 1 kg. Se adapta con facilidad a los 1800-2800 msnm. Su densidad de siembra es de 65000 plantas/ha con un marco de plantación de 35 cm entre surcos y 35 cm entre plantas (Guato, 2015).

1.2 Consideraciones generales del cultivo de brócoli

1.2.1 Origen

El cultivo de brócoli tiene su origen en países con climas templados, a orilla del Mediterráneo oriental, específicamente en la Península de Anatolia donde se observaron los primeros ejemplares provenientes de una planta silvestre de col. Años

más tarde a mediados del siglo XX su producción se desarrolló en Europa (Corrales, 2017).

1.2.2 El brócoli en Ecuador

Ecuador está ubicado en séptimo lugar como exportador de brócoli, en los últimos ocho años el crecimiento de las exportaciones de brócoli en Ecuador fue de 13 %. En la actualidad la superficie sembrada de brócoli alcanza 6000 ha, con un rendimiento promedio de 18 t/ha. Se produce principalmente en Cotopaxi con el 68 % de la producción total (51350 t), seguida por Pichincha e Imbabura que producen el 16 y el 10 % del total nacional, respectivamente (Montalvo, 2014).

1.2.3 Taxonomía

Según Sánchez (2013), el brócoli tiene la taxonomía descrita en la Tabla 2.

Tabla 2.

Clasificación taxonómica de brócoli.

Reino	Plantae
Orden	<i>Caprales</i>
Familia	Brassicaceae
Género	<i>Brassica</i> L.
Especie	<i>Brassica oleracea</i> L.
Variedad	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> Plenck

Elaborado por: las autoras, 2019.

1.2.4 Características

El brócoli en Ecuador no es un cultivo estacional, ya que la temperatura estable a lo largo del año permite mantener una producción continua y un rendimiento consistente (Monge & Alvarez, 2006). Generalmente se adapta mejor en alturas comprendidas

entre los 1100 a 2500 msnm, con una temperatura óptima de 16 a 18 °C (Orozco & Jiménez, 2016).

Según Corrales (2017), presenta las siguientes características: el cogollo puede medir hasta 20 cm de diámetro y pesar 2 kg; las raíces son pivotantes, secundarias y superficiales; el tallo es succulento, no posee ramificaciones y mide entre 2 a 6 cm de diámetro; las hojas poseen una amplia lámina foliar, dentadas, cerosas, de color verde oscuro y con entrenudos cortos, los que dan forma de roseta a la planta; la inflorescencia tiene pedicelos largos con yemas florales verdes, que forman una pella compacta y abierta; las flores son perfectas, actinomorfas y son de color amarillo.

1.2.5 Cultivo

La multiplicación de brócoli puede ser de forma directa, como semilla o por trasplante, sin embargo, lo más aconsejable para el cultivo del brócoli es la producción de plántulas en semillero para ser llevadas posteriormente al campo (Monge & Alvarez, 2006).

La siembra se realiza en pilones, para lo cual se trazan pequeños surcos de 1,0 a 2,0 cm de profundidad, se coloca una semilla y se tapan con el suelo (Vallejo, 2013), las semillas germinan entre los 6 y 10 días, al cabo de 30 días después de la siembra cuando la planta mide de 12 a 15 cm se la trasplanta a suelos de textura media franca, de fácil drenaje, con un alto porcentaje de materia orgánica y con un pH entre 5,5 y 6,5 (Monge & Alvarez, 2006).

1.2.6 Variedad avenger

Esta variedad es un híbrido que posee alto rendimiento y aceptación en Ecuador gracias a su gran capacidad de adaptación a zonas altas (Gutiérrez, 2016).

Es una planta vigorosa y alta, tiene cabezas uniformes de color azul verdoso, presenta granos pequeños, sus tallos son gruesos pero cortos, no tiene brotes laterales, tiene una inserción baja en la pella con hojas largas y anchas que protegen la pella de factores externos, su periodo de cultivo va de 13 a 14 semanas (Arteaga, 2011).

1.3 El género *Bacillus*

El género *Bacillus* fue nombrado por primera vez en 1872 por Ferdinand Cohn para incluir las bacterias en forma de bastones que crecían en filamentos, posteriormente en 1876, Cohn y Koch determinaron que las especies de este género hasta entonces (*B. subtilis* y *B. anthracis*) podían formar una estructura denominada endospora bacteriana o espora, altamente resistente al calor y que sobrevivía a condiciones extremas de hidratación, sequía, calor y luz ultravioleta (Posada, 2017).

Las bacterias de este género llevan su nombre debido a su forma bacilar y presentan las siguientes características: se mueven mediante flagelos, llegan a medir de 0,5 a 10 μm , son Gram positivos, son aerobios estrictos o facultativos, la mayoría de sus especies dan positivos a la prueba de la catalasa y su capacidad de formar endosporas les permite distribuirse en casi todo el suelo, sin embargo, al ser saprofitas prefieren desarrollarse en suelos ricos en sustratos orgánicos (Villarreal et al., 2018).

Su potencial como PGPR se ha evidenciado en varias especies de *Bacillus*, como en *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. licheniformis*, *B. pumilus* ya que son usadas para la solubilización de fosfatos, producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal, fijación biológica del nitrógeno y producción de sustancias que actúan como antagonistas de patógenos o induciendo resistencia en las planta (Tejera, Heydrich, & Rojas, 2013).

1.3.1 *Bacillus subtilis*

Es la bacteria Gram positiva más estudiada hasta el momento, debido a que se distribuye ampliamente en la naturaleza por su facilidad de colonización, forma parte de las 40 especies más reconocidas del género *Bacillus*, se la puede identificar fácilmente ya que forma esporas termorresistentes, tiene la capacidad de hidrolizar almidón y es positiva para la prueba de la catalasa (Espinosa de los Monteros, 2005).

Según Cuervo (2010), puede resistir a la desecación extrema, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos, puede vivir en temperaturas que oscilan entre los 55 a 70 °C, produce enzimas hidrofílicas que descomponen polisacáridos y ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones.

Bacillus subtilis es un gran representante de los PGPR debido a que sintetiza fitohormonas, tales como ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas y citoquininas, que ayudan al crecimiento de la raíz y al incremento de pelos radiculares, además produce un recubrimiento en las semillas que ayuda a las plantas a tener una mejor germinación, vigor y adaptación al suelo (Caicedo & Chacón, 2017).

1.3.2 *Bacillus licheniformis*

Es una bacteria Gram positiva, móvil, formadora de esporas, puede ser aislada de casi todas partes debido a que sus endosporas altamente resistentes se difunden con el polvo, es conocida por producir antibióticos de naturaleza polipeptídica, específicamente bacteriocinas, que afectan a bacterias Gram positivas y hongos fitopatógenos (Reinoso, Casadesús, García, Gutiérrez, & Pazos, 2006). Según Zocorro (2015), esta bacteria es muy conocida en la industria por su facilidad de crecimiento, su desarrollo bajo condiciones extremas, su capacidad de producir altas cantidades de

enzimas extracelulares en condiciones aeróbicas y su capacidad de metabolizar varios tipos de azúcares (xilosa, arabinosa, almidón, celulosa, sacarosa).

Algunos autores han reportado a *Bacillus licheniformis* como biofungicida para algunos fitopatógenos, como método preventivo y curativo de manchas foliares y tizones y como productor de giberelinas (Guillén et al., 2006).

1.3.3 *Bacillus megaterium*

Es una bacteria Gram positiva, aeróbica formadora de esporas, que se encuentra en una gran diversidad de hábitats desde el suelo hasta el agua de mar, sedimentos y arrozales, fue nombrada como “Bestia grande” en 1884 por su gran tamaño y volumen (Vary et al., 2007).

Tortoló & Bell (2015), afirman que debido a las grandes dimensiones de la bacteria y de las esporas, su uso resulta adecuado para investigaciones morfológicas, tales como la biosíntesis de la pared celular y la membrana citoplasmática, la esporulación, estructura de las esporas y la organización celular, la partición de ADN y la localización de proteína.

Bacillus megaterium ha sido reconocido como un agente potencial para el control biológico de enfermedades de las plantas, dentro de sus funciones como PGPR se incluye la fijación de nitrógeno, el suministro de las formas disponibles de fósforo al producir ácidos orgánicos y CO₂ que aumentan la acidez del suelo y convierten las formas insolubles de fósforo en solubles (Elmaghraby, Carimi, Sharaf, Marei, & Hammad, 2015).

1.4 Microorganismos promotores del crecimiento (PGPR)

En el suelo habitan un sin número de microorganismos capaces de incrementar de forma favorable la capacidad que poseen las plantas para acceder a nutrientes indispensables para su desarrollo (Correa, 2016). La cantidad y el tipo de

microorganismos presentes depende de la composición, textura y humedad de cada suelo, actualmente se sabe que existen alrededor de 3000 especies descritas de bacterias y 69000 de hongos (Sagardoy & Mandolesi, 2004).

Con el tiempo estos microorganismos fueron agrupados en un grupo llamado “microorganismos promotores de crecimiento vegetal”, constituido por varias especies de bacterias que pueden favorecer el crecimiento y productividad en las plantas de distintas formas, dentro de este grupo se encuentran los microorganismos que colonizan la raíz y estimulan significativamente el crecimiento de plantas, conocidos como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (González & Fuentes, 2017).

Debido a que puede darse confusión al momento de considerar o no a una rizobacteria como microorganismo promotor de crecimiento Montiel, Gómez, & Veloz (2017), describen algunas características indispensables que deben tener este tipo de microorganismos: a) mantener su densidad población alta después de la aplicación en las plantas para garantizar su competitividad con la flora del suelo, b) alta capacidad de colonizar la raíz, c) presentar características de biocontrolador de microorganismos patógenos y d) ser inocuos para el hombre.

La mayoría de los PGPR que se encuentran en el suelo participan en las diferentes etapas del ciclado de nutrientes para transformar la materia orgánica, en la liberación de nutrientes a partir de minerales insolubles, en la fijación biológica de nitrógeno, en el mejoramiento de la nutrición vegetal a través de micorrizas, en la acción antagónica ante patógenos, entre otros (Sagardoy & Mandolesi, 2004).

Los géneros más conocidos son *Agrobacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Azospirillum* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Caulobacter* sp., *Chromobacterium*

sp., *Erwinia* sp., *Flavobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp. (Muñoz, 2017).

1.4.1 Mecanismos de acción

El crecimiento vegetal por parte de los PGPR puede ser inducido de forma directa e indirecta. La diferencia principal es que los mecanismos indirectos ocurren fuera de la planta, mientras que los directos ocurren dentro de ella y afectan directamente a su metabolismo a través de la modificación de la expresión de genes (Muñoz, 2017).

En general la actividad de los PGPR inicia cuando la bacteria se dirige hacia el rizoplasma de la planta atraída por sustancias secretadas por las raíces, durante este proceso también intervienen “mecanismos de quimiotaxis que están relacionados con la presencia de flagelos, quimiorreceptores y sistemas de regulación codificados genéticamente” (Montiel et al., 2017 p.944).

Dentro de los mecanismos directos más destacados está la producción de metabolitos secundarios (fitohormonas) como auxinas, citoquininas y giberelinas, la intervención en ciclos biogeoquímicos como la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfatos (Camelo, Vera, & Bonilla, 2011).

Por el contrario, del mecanismo indirecto se destacan actividades relacionadas con la modificación del ambiente rizosférico y su ecología, es decir, su papel como agentes de biocontrol, la producción de sideróforos y síntesis de antibióticos (Camelo et al., 2011).

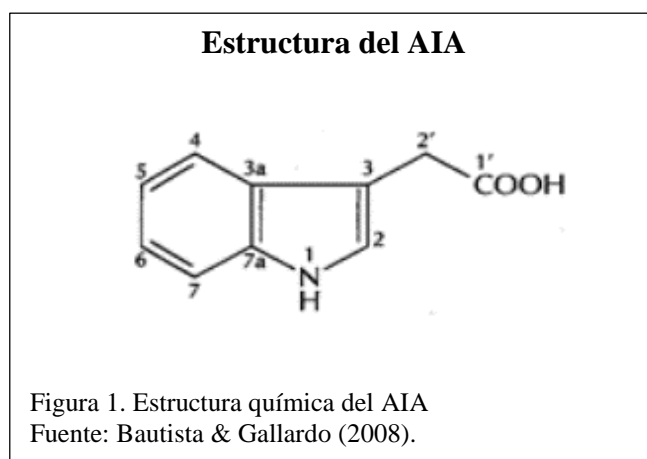
1.5 Producción de auxinas

1.5.1 Auxinas

Las auxinas son fitohormonas caracterizadas por la presencia de un grupo auxínico, su nombre etimológicamente deriva del griego *auxein* y significa aumento o

incremento; químicamente son llamadas ácido indol-3-acético (AIA) (Bautista & Gallardo, 2008).

El AIA es la auxina más activa y su peso molecular es de 175,19 g/mol, su estructura química que se puede ver en la Figura 1, se compone de un grupo indólico, un radical ácido o un compuesto que se pueda convertir fácilmente en ácido, un anillo aromático de benceno y debe contener entre uno y cuatro carbonos entre el grupo carboxilo y el anillo (Bautista & Gallardo, 2008).



El AIA es considerado una de las auxinas más importantes del desarrollo vegetal debido a que interviene en varios procesos, como los tropismos, enraizamiento de esquejes, diferenciación celular y formación de raíces adventicias con lo que a su vez aumenta la absorción de agua, nutrientes y minerales y el incremento celular en tallos y raíces (Prado, 2013).

1.5.2 Bacterias productoras de AIA

En la actualidad también existen auxinas sintéticas utilizadas en la agricultura, pero auxinas como AIA pueden ser sintetizadas por microorganismos como bacterias de los géneros *Bacillus* spp., *Azospirillum* sp., *Azotobacter*., *Pseudomonas*, además se sabe

que el 80 % de especies de bacterias aisladas de la rizosfera tienen la capacidad de producir ácido AIA (Prado, 2013).

1.5.3 Ruta de síntesis de AIA

La ruta de síntesis de AIA parte con triptófano como precursor, aunque también hay rutas que utilizan mutantes auxótrofos de triptófano en la que parten del grupo indol, o indol-glicerol como precursor (Venner & Martin, 2009).

En las plantas el AIA es sintetizado partiendo de L-triptófano el cual se puede encontrar de forma libre o conformando proteínas, la enzima transaminasa transforma el L-triptófano en ácido indol pirúvico, el cual es descarboxilado a indolacetaldehído mediante una enzima descarboxilasa, y finalmente es transformado a ácido indol acético por acción de una enzima oxidasa (Molina, Morales, Bustillos, Rodríguez, Saenz, et al., 2015).

Existen otras dos rutas para la producción de AIA, una de ellas conocida como la ruta de la triptamina y la otra como la vía del indol acetamida. La ruta de la triptamina es importante en bacterias, ya que especies como las del género *Bacillus* están dispuestos de una maquinaria metabólica que les permiten metabolizar compuestos como la tirosina y la fenilalanina en triptófano, produciendo el corismato, posteriormente el antranilato y finalmente formar el triptófano y así poder iniciar con la síntesis de AIA (Figura 2) (Sarmiento, 2014).

Ruta de síntesis de AIA

El diagrama ilustra la ruta de síntesis de AIA (Ácido Indol-3-Acético) a partir del Corimato. La ruta comienza con el Corimato, que se convierte en Triptófano. El Triptófano puede ser convertido en Triptamina por la enzima Trp descarboxilasa, o en Ácido indol-3-pirúvico por la enzima Trp aminotransferasa. El Triptófano también puede ser convertido en Indol-3-acetamida por la enzima Trp monooxygenasa. El Triptamina puede ser convertida en Ácido indol-3-acético por la enzima IAAld oxidasa. El Ácido indol-3-pirúvico puede ser convertido en Ácido indol-3-láctico por la enzima AIP descarboxilasa, o en Indol-3-etanol por la enzima AIP descarboxilasa. El Indol-3-etanol puede ser convertido en Ácido indol-3-acético por la enzima IAAld oxidasa.

Figura 2. Ruta de síntesis de AIA

Fuente: Sarmiento (2014).

Figura 2. Ruta de síntesis de AIA
Fuente: Sarmiento (2014).

1.6 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

1.6.1 Nitrógeno

El nitrógeno atmosférico está conformado por dos átomos de nitrógeno unidos por un triple enlace, este triple enlace hace que las moléculas de nitrógeno no sean fácilmente asimilables por los organismos vivos (Mayz, 2004). Sin embargo existen una grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno que cuentan con la maquinaria metabólica para reducir el nitrógeno atmosférico hasta una forma de nitrógeno que pueda ser utilizado por las plantas (Molina, Morales, Bustillos, Rodríguez, Saenz, et al., 2015).

1.6.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno

Actualmente se conoce que las bacterias fijadoras de nitrógeno ayudan de forma indirecta a incrementar la capacidad de las plantas para absorber el nitrato, mediante

el aumento del volumen radical y de forma directa estimulando el sistema que va a transportar el compuesto final. Esto resulta favorable para el desarrollo vegetal ya que el nitrógeno se encuentra formando parte de las proteínas, ácidos nucleicos y demás componentes celulares (Mayz, 2004).

1.6.3 Mecanismo de fijación de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la capacidad que tienen algunas bacterias de reducir el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4) a través de un complejo enzimático llamado nitrogenasa, este complejo está formado por las enzimas dinitrogenasa que contienen hierro y la reductasa dinitrogenasa formada por hierro y molibdeno (Labra, 2012).

En el proceso de la reducción de N_2 el complejo enzimático actúa rompiendo los enlaces triples del nitrógeno atmosférico, mismos que son altamente estables, generando amoníaco por la adición de átomos de hidrógeno (Labra, 2012). El amonio (NH_4) generado pasa de las bacterias a las plantas hospedadoras, las cuales lo usan como fuente de nitrógeno proporcionando a cambio la fuente de carbono (Vivanco et al., 2016).

Las bacterias que tiene la capacidad de fijar nitrógeno poseen mecanismos que les permiten mantener bajas concentraciones de oxígeno para mantener la eficiencia del complejo nitrogenasa, ya que este se puede ver reducido por la presencia de altas concentraciones de oxígeno (Mayz, 2004).

1.7 Solubilización de fosfatos

1.7.1 Fósforo

El fósforo es un elemento necesario para el desarrollo de las plantas y microorganismos, ya que se encuentra formando parte estructural de los fosfolípidos,

de las membranas celulares y del material genético, además interviene en procesos metabólicos como transporte de energía, procesos de fotosíntesis, glucólisis, respiración y síntesis de ácidos grasos (Corrales, Arévalo, & Moreno, 2014).

El fósforo en su forma orgánica se encuentra entre un 50 a 60 % del suelo, mientras que el resto está en forma inorgánica (Bobadilla & Rincón, 2008). Aunque el fósforo es un componente que se encuentra en gran proporción en el suelo, solamente es soluble en las formas monobásica ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) y dibásica (HPO_4^{-2}), las cuales se encuentran en pequeña proporción y son las formas asimilables para el desarrollo de las plantas (Molina, Morales, Bustillos, Rodríguez, Santiago, et al., 2015).

La fracción de fósforo no disponible aumenta cuando se aplica fósforo inorgánico al suelo como fertilizante, pues este fósforo es inmovilizado en casi un 80 % y con el tiempo pasa a la forma no disponible para las plantas (Ramos, 2015), como fosfato de calcio, fosfato de aluminio e ión fosfato, estas formas insolubles de fósforo pueden cambiar a formas solubles o disponibles por acción de bacterias solubilizadoras de fosfatos (Restrepo et al., 2015).

1.7.2 Bacterias solubilizadoras de fosfatos

Algunas bacterias han sido estudiadas por tener alta capacidad de solubilizar fosfatos entre las que destacan géneros como *Bacillus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Vibrio proteolyticus*, *Enterobacter aerogenes* y *Streptomyces* sp., estas bacterias actúan como PGPR solubilizando los fosfatos a partir de compuestos inorgánicos y orgánicos (Corrales, Sánchez, Arévalo, & Moreno, 2014).

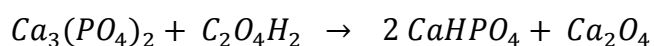
1.7.3 Mecanismo para la solubilización de fosfatos

Para la solubilización las bacterias usan enzimas que son liberadas por la estimulación

de la disponibilidad de materia orgánica o de la necesidad de fósforo, como fosfatasa no específicas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas, o también transformando el fósforo orgánico a formas monobásicas y dibásicas mediante su mineralización por la descomposición de la materia orgánica, este último es el proceso para solubilizar fosfato que más ha sido estudiado (Guzman, 2011).

Las enzimas C-P liasas rompen los enlaces carbono-fósforo de los compuestos organofosforados utilizando los componentes orgánicos del suelo. La producción de ácidos orgánicos permite la liberación de formas de fósforo disponibles, estos ácidos pueden ser el ácido butírico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido Glucónico o el 2-cetoGlucónico (Molina, Morales, Bustillos, Rodríguez, Santiago, et al., 2015). Estos ácidos son de bajo peso molecular y permiten la quimiotaxis microbiana y la detoxificación de los metales (Corrales, Sánchez, et al., 2014).

Los ácidos permiten la absorción del fósforo por la planta mediante la acidificación del suelo, su carga negativa les permite quelar iones metálicos como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+3} , Al^{+3} para la producción de fósforo soluble. Las reacciones químicas que se dan en el metabolismo de las bacterias para convertir el fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en fosfato mono ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) y dibásico (HPO_4^{-2}) asimilable para las plantas, es mediante la ruta metabólica de la glucosa, dando como producto los ácidos mencionados anteriormente y el fósforo disponible, se detalla la reacción a continuación (Corrales, Sánchez, et al., 2014):



Fosfato tricálcico + Ácido oxálico → Fosfato dicálcico + oxalato de calcio

1.8 Medio NFB para la fijación de nitrógeno atmosférico

Para determinar la fijación biológica de nitrógeno, se necesita un medio de cultivo selectivo NFB sólido con azul de bromotimol, mismo que indica la capacidad de los microorganismos inoculados para crecer en ausencia de nitrógeno mineral y en presencia de ácido málico como única fuente de carbono (Martínez et al., 2013). Se considera que el medio NFB en el que se adiciona malato como fuente de carbono es óptimo para el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno, las bacterias empiezan su crecimiento como un velo delgado varios milímetros o centímetros bajo la superficie, en el punto donde la concentración de oxígeno está en equilibrio con la tasa respiratoria de las células, de manera que no hay un exceso en la cantidad de oxígeno disuelto y se puede observar también un viraje de color del indicador azul de bromotimol debido a la alcalinización del medio causada por la oxidación del malato (Baca, Sánchez, Carreño, & Mendoza, 2010).

1.9 Método colorimétrico de Salkowski para la cuantificación de AIA

La reacción de Salkowski permite detectar grupos indoles presentes en el medio de cultivo, el cambio de color es el resultado de una reacción oxidativa con el ácido sulfúrico, donde por medio de una transaminación un grupo amino es sustituido por el cloro proveniente del FeCl_3 , originando un compuesto visible de color rosado a fucsia (positivo), que puede ser cuantificado por espectrofotometría, la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de color producido (Cancino, 2017).

Gonzalez (2013) afirma que a una longitud de onda de 530 nanómetros se da la mayor absorbancia de una solución de AIA, por lo que es óptima para detectar esta hormona en cultivos microbianos suplementados con triptófano.

1.10 Medio Pikovskaya para la solubilización de fosfatos

Para determinar la solubilización de fosfatos es necesario realizar un medio de cultivo Pikovskaya, el cual aporta nitrógeno, energía y otros nutrientes necesarios mediante el extracto de levadura y la dextrosa. Las bacterias con capacidad para solubilizar fosfatos crecen formando una zona clara alrededor de la colonia, debido a que las enzimas fosfatasas catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico. La presencia de ácidos orgánicos, como el oxálico permiten la acidificación del medio por lo que se produce el viraje de color del indicador purpura de bromocresol de morado a amarillo (Corrales, Sánchez, et al., 2014).

1.11 Método colorimétrico de Mo-Blue para la cuantificación de fosfatos

El método Mo-Blue o método del ácido ascórbico, fue propuesto por Murphy and Riley (1962), para cuantificar el fósforo disuelto en el medio de cultivo por bacterias solubilizadoras de fosfato. En solución sulfúrica los iones ortofosfato reaccionan con los iones molibdato dando ácido molibdofosfórico, el cual, con ácido ascórbico, se reduce a fosfomolibdeno, que al cabo de 5 minutos presenta una coloración azul y absorbe a una longitud de onda de 880 nm y por lo tanto se puede cuantificar por espectrofotometría (O. Rodríguez, Aguilera, & Pérez, 2013). Para la cuantificación de fosfatos por el método nombrado, es necesario proporcionar en el medio de cultivo una fuente de glucosa o sacarosa como fuente donadora de electrones, pH de entre 6.0 y 8.0, y temperaturas óptimas entre 30 y 37 °C (Shukor & Syed, 2010).

1.12 Eficiencia fotosintética

Se define como eficiencia cuántica real del fotosistema II (PSII) a la eficiencia con la cual los electrones son procesados en la fotosíntesis por cantidad de luz absorbida y se expresa como la relación F_v/F_m , donde F_v es la fluorescencia variable que es un valor resultado de la diferencia entre la fluorescencia mínima F_o (centros de reacción

abiertos) y la fluorescencia máxima. Este valor se lo divide entre F_m que es la fluorescencia máxima cuando una planta está adaptada a condiciones de luz (centros de reacción están cerrados) (Sanclemente & Enrique, 2008).

La eficiencia fotosintética puede verse afectada por diferentes factores, el primero es el nivel bajo de nitrógeno, ya que disminuyen el peso seco, el número de hojas y el área foliar, sin embargo, esta correlación también varía dependiendo del hábitat de la planta, la temperatura y la radiación. El segundo es la disminución del contenido de la enzima rubisco y la clorofila en las hojas (Sanclemente & Enrique, 2008).

1.13 Diseño completamente al azar (DCA)

La característica de este diseño es que se utilizan en ensayos donde todas las posibles fuentes de variación o de influencia están controladas y sólo hay efecto de un solo factor en estudio, para el cual se consideran al menos 3 tratamientos, con n repeticiones dentro de cada tratamiento, además los tratamientos son ubicados espacialmente al azar (Cervantes & Marques, 2007).

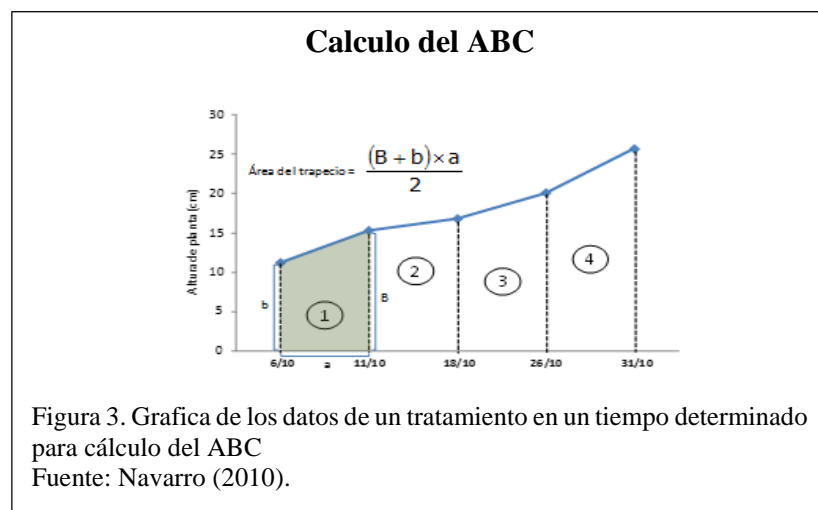
1.14 Prueba POST HOC Tukey

La prueba de Tukey es la prueba más aplicada ya que controla de mejor manera los dos errores ampliamente conocidos en la estadística (α y β), también permite hacer todas las posibles comparaciones de tratamientos de dos en dos (Wong, 2010).

Maneja la distribución de probabilidad llamada distribución de rango estudentizado creando intervalos de confianza, para disminuir la tasa de error, el método ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual para que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor que se especifique en el ensayo. (Collaguazo & Tenorio, 2018,p.17)

1.15 Área bajo la curva (ABC)

La metodología del área bajo la curva nos permite reducir la clasificación de los datos cuando se realizan varias evaluaciones a lo largo de un ensayo. El análisis de varianza exige que el efecto de los distintos tratamientos que se evalúan en un ensayo sean independientes, sin embargo, las evaluaciones semanales de las unidades experimentales no son independientes, por lo que se utiliza esta metodología que no es estadística, sino que es un acondicionamiento de las variables que se mide con regularidad en un ensayo. El cálculo del área bajo la curva permite obtener una gráfica como la que se muestra en la Figura 3 con los datos que se obtienen de un tratamiento en una repetición, en la gráfica se forman trapecios bajo la línea de comportamiento en función del tiempo, cuando se obtiene el área de cada trapecio se puede calcular el área bajo la curva para ese tratamiento en función del tiempo, por lo tanto, se puede identificar la correlación entre los tratamientos y el desarrollo de las plantas a través del tiempo de estudio (Navarro, 2010).



Capítulo 2

2. Metodología

2.1 Fase de laboratorio

Para esta fase se usaron cinco cepas de *Bacillus* spp. Tabla 3 que se conservan en criocongelación a -80 °C en el banco de cepas del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI), en el laboratorio Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

Tabla 3.

Codificación de las cepas de *Bacillus* spp.

Cepa	Codificación
<i>Bacillus subtilis</i>	BS
<i>Bacillus licheniformis</i>	BL
<i>Bacillus megaterium</i>	BM y CT11
ATCC <i>Bacillus subtilis</i>	C +

Elaborado por: las autoras, 2019.

2.1.1 Fijación de nitrógeno atmosférico

2.1.1.1 Reactivación de cepas de *Bacillus* spp. y siembra en medio NFB

Las cepas se reactivaron en cajas Petri con Agar nutritivo y se incubaron a 37 °C por 24 horas, para preparar el medio de cultivo NFB se utilizó la formulación propuesta por Ramírez, Camacho, Reyes, & Esquivel (2015), ver Anexo 1.1, una vez listo el medio se ajustó el pH a 6 con KOH (1 N) y se autoclavó a 121 °C por 15 minutos y 1 atm.

Las cepas reactivadas previamente se sembraron con la ayuda de un asa microbiológica por estriado en el medio NFB en tubos y cajas Petri y se incubó a 37 °C durante 48 horas, como control negativo se utilizó medio NFB sin inocular.

2.1.2 Análisis cualitativo de la producción de AIA

2.1.2.1 Reactivación de cepas de *Bacillus* spp. y siembra en medio TSB

Se reactivaron las cepas de *Bacillus* spp., sembrando una perla de cryobank en tubos de ensayo con caldo nutritivo y se incubaron a 37 °C por 48 horas.

La siembra en medio TSB se realizó según la metodología usada por Posada (2017), con las siguientes modificaciones: se sembró 100 µL de las bacterias incubadas previamente en caldo nutritivo, en 6 mL de TSB suplementado con L-Triptófano (1 mg/mL), en tubos de ensayo, como control negativo se usó medio sin inocular y se incubó a 30 °C y 100 rpm durante 4 días.

2.1.2.2 Preparación del reactivo Salkowsky y detección de auxinas

Se realizó una solución de 15 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,5 M) y se añadió 300 mL de H_2SO_4 y 500 mL de agua destilada, el reactivo es de color amarillo (Leopold, 1960).

Concluido el periodo de incubación, se centrifugaron los tubos a 3000 rpm por 15 minutos, se tomó 1 mL de sobrenadante y se mezcló con 4 mL del reactivo Salkowsky, al cabo de unos minutos se observó el cambio de color de amarillo a rosado.

2.1.3 Análisis cuantitativo de la producción de AIA

2.1.3.1 Curva de calibración y espectrofotometría

Se preparó la solución madre de 1000 ppm (µg/mL), disolviendo 0,1 g de AIA comercial SIGMA en 100 mL de etanol (96 %), a partir de esta solución se realizaron las soluciones estándar detalladas en la Tabla 4, como blanco se usó etanol con reactivo de Salkowsky (ver Anexo 5) (Posada, 2017).

Tabla 4.

Curva de calibración de AIA

Soluciones	AIA	Agua
estándar (µg/mL)	[µL]	destilada [µL]
5	5	995
10	10	990
15	15	985
20	20	980
25	25	975
30	30	970
35	35	965
40	40	960
45	45	955
50	50	950

Elaborado por: las autoras, 2019.

Una vez preparadas las soluciones y el blanco se añadió 4 mL del reactivo Salkowsky, se agito y dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos, terminado este tiempo se midió la absorbancia a 530 nm de las soluciones y de las muestras obtenidas del punto 2.1.2.2.

2.1.4 Análisis cualitativo de la solubilización de fosfatos

2.1.4.1 Reactivación de cepas de *Bacillus* spp. y siembra en medio Pikovskaya

Las cepas se reactivaron en cajas Petri con Agar nutritivo a 37 °C por 24 horas, para preparar el medio de cultivo Pikovskaya se utilizó la formulación propuesta por Corrales, Sánchez, Arévalo, & Moreno (2014) ver Anexo 1.2 y se autoclavó a 121 °C por 15 minutos y 1 atm, el fosfato tricálcico se esterilizó en seco por separado y se

agregó al medio estéril. Posteriormente se sembró las cepas reactivadas en medio Pikovskaya con la ayuda de un asa microbiológica por la técnica de botón en cuatro cuadrantes de la caja Petri, como control negativo se usó medio sin inocular y se incubó a 37 °C durante 48 horas (Corrales, Sánchez, et al., 2014).

2.1.5 Índice de solubilización de fosfatos

A las 24 y 48 horas se realizó una lectura para observar cambios en el tamaño del halo de solubilización (halo claro alrededor de las colonias) en el medio Pikovskaya descrito en el punto 2.1.4 y se realizaron los respectivos cálculos aplicando la fórmula descrita por Corrales et al.(2014) para hallar el índice de solubilización.

$$IS = \frac{\text{Diámetro de la colonia (mm)} + \text{diámetro del halo(mm)}}{\text{Diámetro de la colonia (mm)}}$$

2.1.6 Análisis cuantitativo de la solubilización de fosfatos

2.1.6.1 Reactivación de cepas de *Bacillus* spp. y siembra en medio NBRIP

Se reactivó las cepas de *Bacillus* spp., sembrando una perla del cryobank en caldo nutritivo en tubos de ensayo y se incubó a 37 °C durante 48 horas.

Se preparó el medio de cultivo NBRIP con la formulación usada por Tejera et al. (2013), ver Anexo 1.3 y se autoclavó a 121 °C por 15 minutos y 1 atm, el fosfato tricálcico se esterilizó en seco por separado y se agregó al medio estéril. Se sembró 200 µL de las bacterias inoculadas previamente en caldo nutriente en matraces de 100 mL con 50 mL de medio NBRIP y se incubó en agitación a 30° C y 100 rpm, durante 7 días (O. Rodríguez et al., 2013).

2.1.6.2 Preparación del reactivo Mo-blue

Se preparó las soluciones de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 5N), tartrato de antimonio y

potasio ($\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$) y ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) según Murphy & Riley (1962), y se mezcló en ese orden obteniendo un reactivo de color amarillo.

2.1.6.3 Curva de calibración y espectrofotometría

Se realizó una solución madre de 40 ppm ($\mu\text{g/mL}$), disolviendo 0,1757 g de KH_2PO_4 en 1 L de agua destilada y posteriormente se realizó los estándares detallados en la Tabla 5, como blanco se usó agua con reactivo Mo-blue, ver Anexo 5 (Murphy & Riley, 1962).

Tabla 5.

Curva de calibración de fosfatos

Soluciones	Fosfatos	Agua
Estándar	[μL]	destilada [μL]
($\mu\text{g/mL}$)		
1	50	1550
2	100	1500
4	200	1400
6	300	1300
8	400	1200
10	500	1100

Elaborado por: las autoras, 2019.

A las soluciones estándar preparadas se les añadió 400 μL de reactivo Mo-Blue, se aforó con agua destilada con los datos que se muestran en la Tabla 4, se agitó y dejó reposar en la oscuridad a temperatura ambiente. A los 15 minutos se midió la absorbancia a 880 nm de las soluciones y de las muestras obtenidas del punto 2.1.6.1

(para las muestras solo se tomó 500 µL del sobrenadante).

2.2 Fase de campo

La fase de campo de este estudio se realizó en la provincia de Tungurahua, en la parroquia Izamba, los detalles se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.

Características geográficas y ambientales de la localización del ensayo

Provincia	Tungurahua
Cantón	Ambato
Parroquia	Izamba
Altitud	2590 m.s.n.m
Coordenadas	X77034.76815062 Y9864922.60691711
Temperatura Media	14.6 °C
Humedad Media	68.57 %

Nota: m.s.n.m: metros sobre el nivel del mar; Coordenadas obtenidas por GPS

Fuente: Collaguazo & Tenorio (2018).

A partir de las pruebas realizadas en el laboratorio se seleccionaron las dos mejores cepas de *Bacillus* para ensayos en campo de las especies hortícolas: brócoli variedad Avenger y lechuga variedad Coolguard.

2.2.1 Diseño en campo

Para el diseño en campo se escogieron las dos cepas que obtuvieron la mejor respuesta como PGPR a partir de las pruebas realizadas en laboratorio, y se implementaron 5 tratamientos incluyendo un testigo, 3 repeticiones por cada tratamiento, una bandeja por unidad experimental (UE) dando un total de 15 UE para cada especie hortícola.

Se realizaron 2 formas distintas de aplicación para cada cepa seleccionada, una forma consistió en una sola aplicación al momento de la siembra y la otra en aplicaciones semanales durante un periodo de cuatro semanas.

2.2.2 Diseño experimental

En el análisis estadístico de la fase de campo se utilizó un Diseño completamente al azar (DCA) en función del esquema ANOVA que se muestra a continuación en la Tabla 7.

Tabla 7.

Esquema ANOVA

Fuentes de variación	Grados de Libertad
Tratamiento	4
Error experimental	10
Total	14

Elaborado por: las autoras, 2019.

Los datos se procesaron en el programa Infostat Versión 2016 con pruebas Post Hoc de Tukey al 5 %.

2.2.3 Preparación del inóculo bacteriano

Se utilizó un biopreparado sólido a una concentración de 1×10^8 UFC/g, preparado bajo la metodología de Collaguazo & Tenorio (2018), en el cual se utilizó salvado de trigo como sustrato, panela molida como fuente de carbono y harina de soya como fuente de nitrógeno.

Se fermentó el biopreparado sólido en una solución de agua con panela durante 24 horas con la finalidad de activar las cepas. Para la aplicación se utilizó agua potable

reposada para eliminar el cloro y la concentración bacteriana para la aplicación fue de 1×10^6 UFC/mL.

2.2.4 Siembra de semillas

Para el ensayo se realizó la siembra de semillas en bandejas de germinación de 338 hoyos. Se colocó una cantidad de turba en cada hoyo de la bandeja, posteriormente se sembraron las semillas y se tapó con más turba para permitir su germinación, finalmente se dejaron las semillas bajo invernadero, Anexo 6. Para la evaluación se utilizó la especie brócoli variedad Avenger y la especie lechuga variedad Coolguard.

2.2.5 Tratamientos

La aplicación de los tratamientos se realizó como se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8.

Descripción de los tratamientos aplicados en campo

Tratamiento	Descripción
1	Aplicación a la siembra de la cepa <i>Bacillus</i> 1 a una concentración de 1×10^6 UFC/mL
2	Aplicación a la siembra más cuatro aplicaciones semanales de la cepa <i>Bacillus</i> 1 a una concentración de 1×10^6 UFC/mL
3	Aplicación a la siembra de la cepa <i>Bacillus</i> 2 a una concentración de 1×10^6 UFC/mL
4	Aplicación a la siembra más cuatro aplicaciones semanales de la cepa <i>Bacillus</i> 2 a una concentración de 1×10^6 UFC/mL
5	Aplicación de agua potable

Elaborado por: las autoras, 2019.

La aplicación de los tratamientos se realizó en aspersión directa mediante el uso de bombas manuales, se utilizó una bomba diferente para cada cepa.

2.2.6 Área bajo la curva (ABC)

Para la evaluación del desarrollo de las plántulas en cuanto a altura y grosor se realizó el análisis del área bajo la curva (ABC) tanto para la variable altura como para la variable grosor.

El cálculo del ABC se realizó con la fórmula propuesta en 1990 por Cambell y Madden, citada por Jimenez & Gómez (2012).

$$ABC = \sum \left(\frac{X_{i+1} + X_i (t_{i+1} - t_i)}{2} \right)$$

Donde:

X_i = Desarrollo de la plántula (altura o grosor)

$i = 1$

t = Tiempo (días)

2.2.7 Variables y métodos de evaluación

2.2.7.1 Porcentaje de germinación

Se realizó el conteo de las plantas germinadas de cada bandeja a la quinta semana de la siembra, y se determinó el porcentaje de germinación de cada tratamiento con la siguiente fórmula (Obando, 2013):

$$\% \text{ Germinación} = \frac{\text{Nº semillas germinadas}}{\text{Nº total de semillas}} \times 100$$

2.2.7.2 Altura de la planta

La altura se midió cada semana a partir de los 7 días posteriores a la siembra, se tomaron al azar 20 plántulas de cada bandeja y se midió la altura en milímetros (mm) con la ayuda de un pie de rey, desde la base de la plántula hasta su punto más alto.

2.2.7.3 Grosor del tallo

El grosor del tallo de las plántulas se midió a partir de la segunda semana posterior a la siembra, dado que en la primera semana la plántula es muy frágil para poder tomar dicha medida. Se tomó al azar 20 plantas de cada bandeja y se midió el grosor en milímetros (mm) con la ayuda de un pie de rey. Esta medida se tomó cada semana hasta la semana de recolección (semana 5).

2.2.7.4 Eficiencia fotosintética

Se tomaron al azar 10 plantas por cada tratamiento y se midió la eficiencia cuántica del fotosistema II con ayuda del equipo OS-30p+Chlorophyll Fluorometer, en las semanas 3, 4 y 5 (ver Anexo 6).

2.2.7.5 Materia verde de la parte aérea

En la sexta semana a partir de la siembra se tomaron 10 plantas por tratamiento y por repetición. Se trasladaron las plántulas escogidas al Laboratorio de Calidad de la Leche ubicado en la sede de la Universidad Politécnica Salesiana en el cantón Cayambe.

Se separó la raíz de la parte aérea de la plántula con ayuda de un bisturí, posteriormente se colocó la parte aérea en fundas de papel previamente pesadas y se determinó el peso verde en una balanza analítica.

2.2.7.6 Materia seca de la parte aérea

Se colocó las fundas de papel que contienen la parte aérea de la plántula, en una estufa a 70 °C durante 48 horas, cumplido este tiempo se sacaron las fundas de la estufa y se colocaron en un desecador donde permanecieron durante 24 horas, finalmente se tomó el peso seco en una balanza analítica (ver Anexo 6).

2.2.7.7 Longitud y peso de la raíz

Se usó las raíces de las plantas escogidas para el cálculo de la materia verde, se retiró la turba de la raíz con ayuda de agua, se dejó secar durante 20 minutos al ambiente y se determinó su longitud con la ayuda del pie de rey y su peso con una balanza analítica (ver Anexo 6).

Capítulo 3

3. Resultados y discusión

3.1 Fase de laboratorio

3.1.1 Fijación de nitrógeno atmosférico

El análisis cualitativo basado en el cambio colorimétrico del medio de cultivo NFB resulto positivo para todas las cepas de *Bacillus* spp. analizadas ver Tabla 9.

Tabla 9.

Fijación biológica de nitrógeno atmosférico por las cepas de *Bacillus* spp.

Cepa	Fijación biológica de nitrógeno		
	24 horas		
Repetición	1	2	3
BS	+	+	+
BM	+	+	+
BL	+	+	+
CT11	+	+	+
C +	+	+	+
C -	-	-	-

Elaborado por: las autoras, 2019.

Como se puede observar en la Figura 4 el viraje de color producido por el indicador azul de bromotimol, de verde a azul se da en todas las cepas a las 24 horas y, el control negativo se mantiene de color verde. El crecimiento de colonias se pudo observar a partir del tercer día de incubación.

Fijación biológica de nitrógeno por las cepas de *Bacillus* spp.

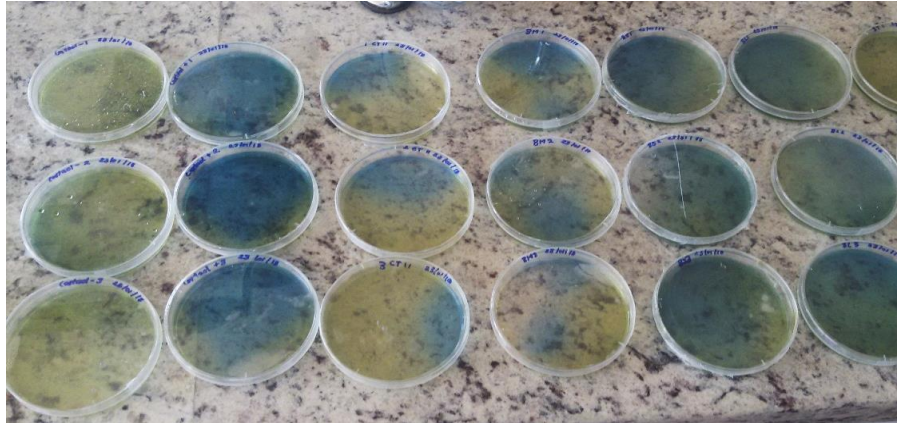


Figura 4. Fijación biológica de nitrógeno a las 24 horas, columnas de izquierda a derecha: C+, C-, CT11, BM, BS, BL.
Elaborado por: las autoras, 2019.

Posada (2017), determinó la presencia de los genes *nifU*, *nifS*, *nifV* y *nifF* en *B. subtilis*, los cuales están involucrados en la formación de los clusters de la enzima nitrogenasa encargada de la fijación biológica de nitrógeno, por lo que esta cepa resultó positiva al observarse la presencia de manto bacteriano y el viraje del color del medio NFB de verde a azul.

La fijación biológica de nitrógeno por parte de cepas de *Bacillus megaterium* y *Bacillus subtilis*, también fue registrada por Martínez, Peniche, Iturriaga, Medrano, & Pacheco (2013), ya que evidenciaron crecimiento bacteriano en medio NFB.

Mediante ensayos con medio carente de nitrógeno Mota (2013), demostró que *B. licheniformis* es potencialmente capaz de fijar nitrógeno, sin embargo, su crecimiento es lento cuando se emplea glucosa y ácido málico como sustratos, lo que sustenta el desarrollo lento de colonias que se pudo evidenciar en los ensayos realizados.

3.1.2 Producción de ácido indolacético

Mediante el método colorimétrico de Salkowsky se pudo observar la generación de un compuesto visible de color rosado a fucsia a los pocos minutos de haber añadido el reactivo en todas las cepas de *Bacillus* spp. analizadas, Tabla 10.

Tabla 10.

Producción de AIA por las cepas de *Bacillus* spp.

Cepa	Producción de AIA		
	1	2	3
Repetición			
BS	+	+	+
BM	+	+	+
BL	+	+	+
CT11	+	+	+
C +	+	+	+
C -	-	-	-

Elaborado por: las autoras, 2019.

Las tonalidades de los colores variaron como se observa en la Figura 5, y al compararlas con el control negativo es evidente la producción de AIA, la concentración de indol es directamente proporcional a la intensidad de color producido.

Producción de AIA por las cepas de *Bacillus* spp.

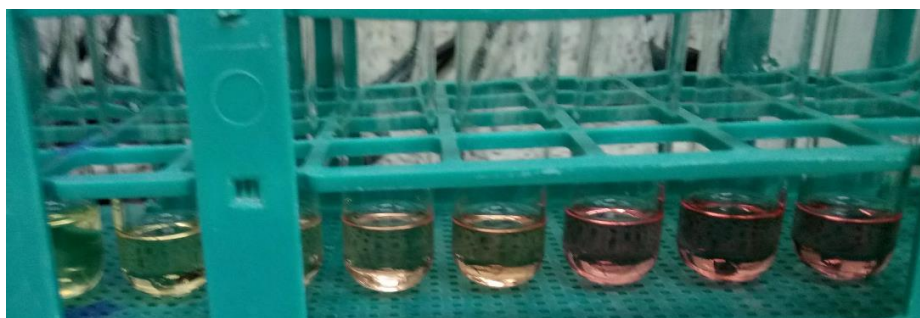


Figura 5. Producción de AIA, primer tubo a la izquierda control negativo.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.1.2.1 Cuantificación de ácido indolacético

La lectura de los estándares de soluciones de Ácido Indolacético, con diferentes concentraciones arrojaron los datos de absorbancia descritos en la Tabla 11.

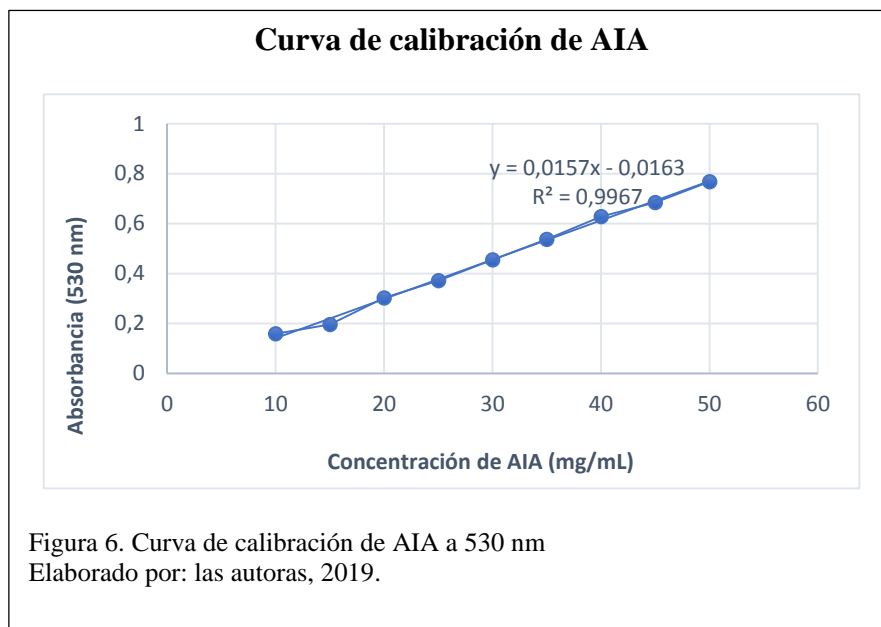
Tabla 11.

Absorbancias para la curva de calibración de AIA

PPM	ABS 530 nm \pm sd
10	0,1588 \pm 0,0001
15	0,1960 \pm 0,0027
20	0,3022 \pm 0,0076
25	0,3712 \pm 0,0008
30	0,4545 \pm 0,0012
35	0,5367 \pm 0,0005
40	0,6277 \pm 0,0018
45	0,6840 \pm 0,0002
50	0,7680 \pm 0,0019

Nota: Los datos corresponden a la media de tres repeticiones
Elaborado por: las autoras, 2019.

Utilizando el programa Microsoft Excel 365 ProPlus se obtuvo una ecuación de la recta $y = 0,0157x - 0,0163$, con un R^2 de 0,9967 que relaciona la absorbancia en función de la concentración como se muestra en la Figura 6.



Con esta ecuación se determinaron las concentraciones de ácido indolacético producidas por cada microorganismo detalladas en la Tabla 12, se realizó un análisis de varianza donde se hallaron diferencias estadísticas altamente significativas para la producción de AIA ya que se obtuvo un F de 376,15 y p-valor de 0,0001 ver Anexo 2.1 y mediante la prueba de Tukey al 5 % se estableció que la cepa CT11 y BS son estadísticamente similares, sin embargo la cepa BL destaca con su promedio en comparación al testigo.

Tabla 12.

Concentración de AIA producido por las cepas de *Bacillus* spp.

Cepa	ABS \pm sd	PPM \pm sd
BL	0,1621 \pm 0,0014	11,4050 \pm 0,0879 a
CT11	0,1226 \pm 0,0072	8,9040 \pm 0,4550 b
BS	0,1171 \pm 0,0030	8,5503 \pm 0,1904 b
C +	0,0970 \pm 0,0063	7,2814 \pm 0,3985 c
BM	0,0933 \pm 0,0058	7,0426 \pm 0,3695 c
C -	0,0025 \pm 0,0001	1,2907 \pm 0,0088 d

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.

Elaborado por: las autoras, 2019.

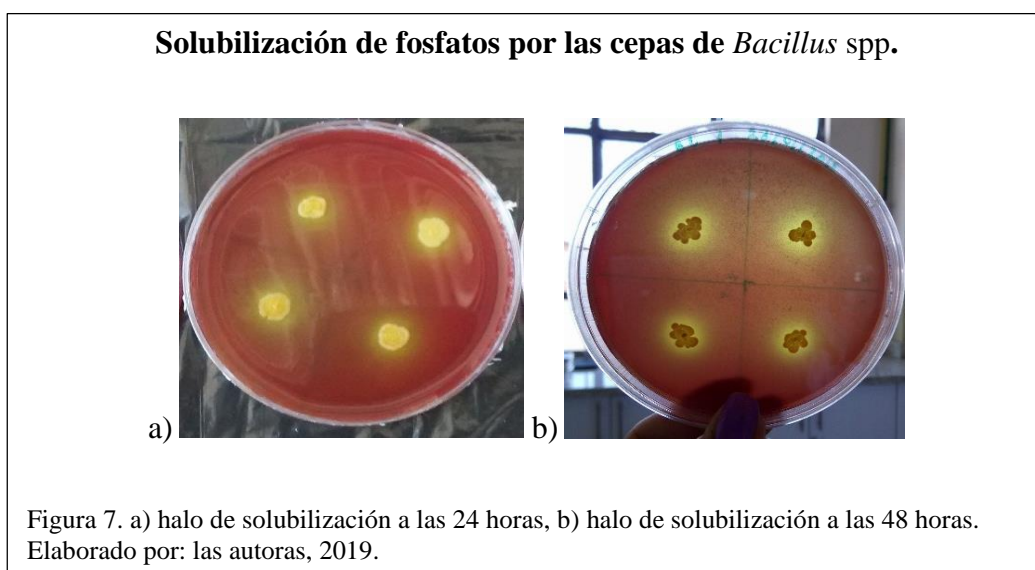
Mantilla (2007), en su investigación probó la producción de indoles en presencia y ausencia de triptófano obteniendo una concentración de 7,3 a 32,8 $\mu\text{g/mL}$ de auxinas por parte de *Bacillus* sp. en los medios de cultivo que contenían 1, 2 y 5 mg/mL de triptófano. Tejera et al. (2011), también cuantificaron auxinas mediante el método colorimétrico de Salkowski, con resultados que varían entre los 1 y 17 $\mu\text{g/mL}$ para cepas de *Bacillus* spp.

Posada (2017), determinó específicamente que *B. subtilis* produce indoles totales en una concentración de 15 $\mu\text{g/mL}$ usando 500 mg/mL de L-triptófano. Para *B. megaterium* se han reportado concentraciones de 6,3 a 7,1 mg/L en medio de cultivo suplementado con 1 mg/mL de triptófano (Chávez, Hernández, Cabrera, Luna, & Pacheco, 2016). Y para *B. licheniformis* se han obtenido concentraciones de 35,15 $\mu\text{g/mL}$ en medio de cultivo líquido con K-lactato suplementado de triptófano a 100 mg/L (D. Sánchez & Pérez, 2018).

3.1.3 Solubilización de fosfatos

3.1.3.1 Índice de solubilización

Las pruebas fueron positivas para la solubilización de fosfato para todas las cepas de *Bacillus* spp. analizadas, ya que el indicador púrpura de bromocresol cambio en el medio Pikovskaya de color morado a amarillo. Además del cambio de color se observó la formación del halo de solubilización blanco alrededor de la colonia en todos los cuadrantes de la caja Petri como se puede ver en la Figura 7.



En la Tabla 13 se observan el diámetro de la colonia y del halo de solubilización a las 24 y 48 horas de incubación, con estos datos se obtuvo el índice de solubilización con la formula citada en el punto 2.1.5, Figura 8.

Tabla 13.

Diámetro de la colonia y halo de solubilización a las 24 y 48 horas en medio Pikovskaya (mm).

Diámetro de la colonia y halo de solubilización a las 24 y 48 horas en medio			
Pikovskaya (mm)			
TIEMPO		24 HORAS	48 HORAS
CEPA		Media	Media
BM	Colonia	4,7	7,5
	Halo	6,9	11,8
BS	Colonia	5,7	6,6
	Halo	7,9	11,6
BL	Colonia	7,0	7,4
	Halo	9,0	11,0
C +	Colonia	5,3	6,0
	Halo	7,1	8,3
CT11	Colonia	4,5	7,8
	Halo	6,8	12,7
C -	Colonia	0,0	0,0
	Halo	0,0	0,0

Nota: Los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

Comparación del índice de solubilización de las cepas de *Bacillus* spp.

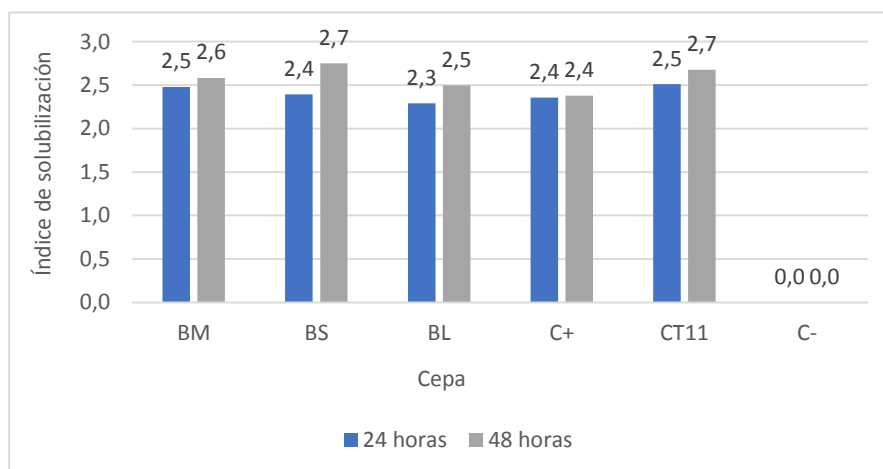


Figura 8. Comparación de los índices de solubilización a las 24 y 48 horas de incubación. Elaborado por: las autoras, 2019.

Los datos del IS fueron analizados mediante un análisis de varianza concluyendo que el índice entre las cepas a las 24 y 48 horas presenta diferencias estadísticas altamente significativas en comparación con el testigo. A las 24 horas se obtuvo un F de 149,97 y un p-valor de 0,0001, a las 48 horas se obtuvo un F de 81,95 y un p-valor de 0,0001, ver Anexo 2.2 y 2.3. Mediante la prueba de Tukey de la Figura 9 se evidenció que entre cepas no hay diferencia estadística ya que todas comparten la misma letra.

Índice de solubilización de las cepas de *Bacillus* spp., Tukey al 5 %

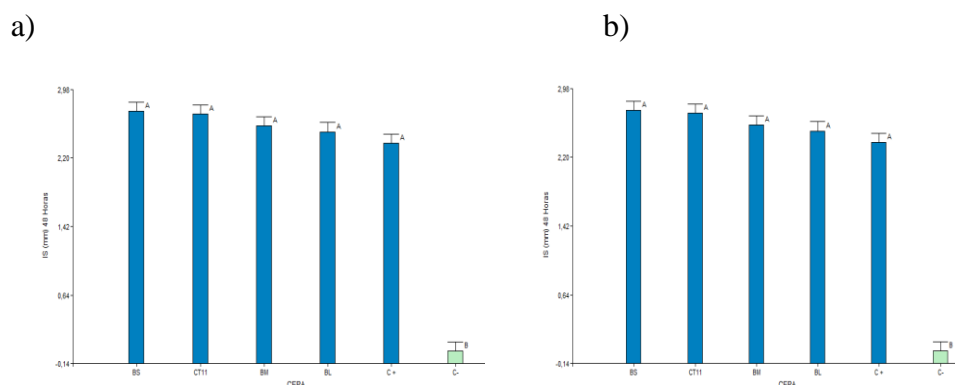


Figura 9. a) índice de solubilización a las 24 horas b) índice de solubilización a las 48 horas. Elaborado por: las autoras, 2019.

Corrales, Arévalo, & Moreno (2014), reportan la actividad máxima de solubilización de fosfato con índices de solubilización de 3,1 mm y 3,0 mm con una variación en el tamaño del halo de 2,0 a 5,0 mm en agar Pikovskaya. Corrales, Sánchez, Arévalo, & Moreno (2014) reportaron resultados similares del índice de solubilización de 11 cepas de *Bacillus* las cuales no mostraron cambios significativos en el índice de solubilización en el medio Pikovskaya durante las 24 y 48 horas de incubación y el rango promedio para las cepas que presentaron los índices más bajos, osciló entre 2 y 3 mm. Sin embargo, mediante la prueba realizada en el laboratorio obtuvimos halos de solubilización entre 6 y 12,7 mm de diámetro.

3.1.3.2 Cuantificación de fosfatos solubilizados

La lectura de los estándares de soluciones de KH_2PO_4 , con diferentes concentraciones arrojaron los datos de absorbancia que se muestran en la Tabla 14.

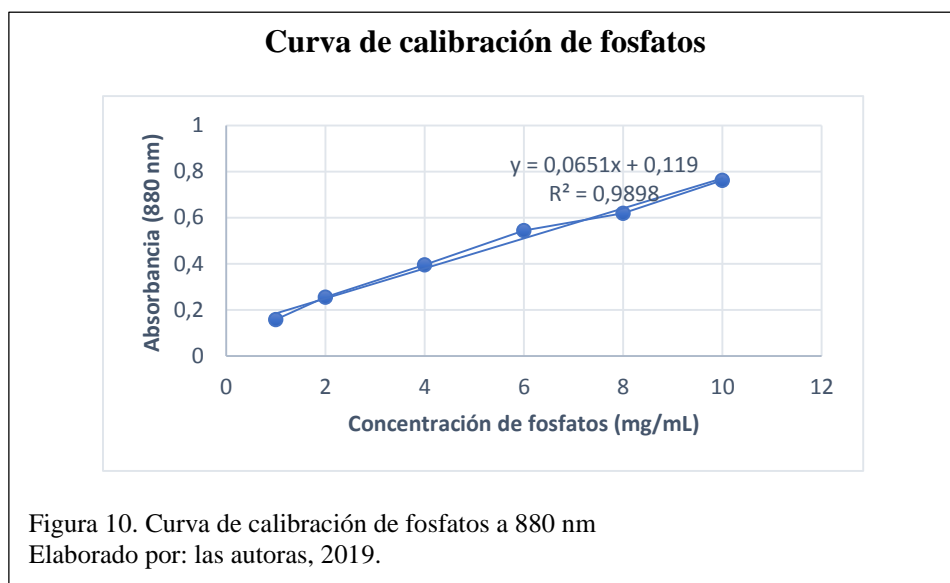
Tabla 14.

Absorbancias para la curva de calibración de fosfatos

PPM	ABS 8800 nm \pm sd
1	0,1582 \pm 0,0002
2	0,2546 \pm 0,0004
4	0,3960 \pm 0,0021
6	0,5437 \pm 0,0148
8	0,6184 \pm 0,0042
10	0,7623 \pm 0,0025

Nota: Los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

Utilizando el programa Microsoft Excel 365 ProPlus se obtuvo una ecuación de la recta $y = 0,0651x + 0,119$, con un R^2 de 0,9898 que relaciona la absorbancia en función de la concentración como se muestra en la Figura 10.



Con esta ecuación se determinaron las concentraciones de fosfato solubilizados por cada microorganismo. A los datos de concentración en ppm que se detallan en la Tabla 15 se les realizó un análisis de varianza descrito en el Anexo 2.4 donde se hallaron diferencias estadísticas altamente significativas para la solubilización de fosfatos ya que se obtuvo un F de 493,64 y un p-valor de 0,0001, por lo que con ayuda de la prueba de Tukey al 5 % se estableció que la cepa CT11, BL y C + son estadísticamente similares, sin embargo, la cepa CT11 y la cepa BL presentan los promedios más altos.

Tabla 15.

Concentración de fosfatos solubilizados por las cepas de *Bacillus* spp.

Cepa	ABS \pm sd	PPM \pm sd
CT11	2,9599 \pm 0,0053	43,2257 \pm 0,0799 a
BL	2,8628 \pm 0,1139	41,7501 \pm 1,7302 a
C +	2,7723 \pm 0,1026	40,3743 \pm 1,5599 a
BM	2,4785 \pm 0,0590	35,9090 \pm 0,8974 b
BS	2,4360 \pm 0,1063	35,2631 \pm 1,6154 b
C -	0,2409 \pm 0,0091	1,9054 \pm 0,1385 c

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.

Elaborado por: las autoras, 2019.

Tejera et al. (2013), identificaron 19 cepas de *Bacillus* con la capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos en medio NBRIP líquido, en concentraciones de fosfato soluble de 0,23 y 11,58 mg/L. En su investigación Chávez et al. (2016) evaluó la capacidad de solubilizar fosfatos de calcio, cultivando cepas de *Bacillus* en medio NBRIP durante 5 días a 30 °C con agitación constante y obtuvo valores de 26,0 a 134,6 mg/L de fósforo soluble.

3.2 Fase de campo

Para evaluación de las cepas en fase de campo se eligieron a las cepas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus megaterium*, que presentaron los mejores resultados en la fase de laboratorio. Las dos cepas dieron positivo en la capacidad de fijar nitrógeno, produjeron auxinas con valores de $11,4050 \pm 0,0879$ y $8,9040 \pm 0,4550$ ppm respectivamente, y solubilizaron $41,7501 \pm 1,7302$ y $43,2257 \pm 0,0799$ ppm de fosfatos respectivamente. Los tratamientos se aplicaron como se muestra en el capítulo 2, Tabla 8, donde *Bacillus* 1 es *B. licheniformis* y *Bacillus* 2 es *B. megaterium*.

3.2.1 Especie lechuga

3.2.1.1 Altura

En el Anexo 3.1 se muestra el análisis de varianza del ABC para la variable altura, con un valor F de 6,40 y un p-valor de 0,0081 que nos permiten concluir que al menos uno de los tratamientos aplicados presenta diferencia significativa en la altura de las plántulas.

En la Tabla 16 se observan dos grupos diferenciados A, B de la prueba Tukey al 5%. En el primer grupo se encuentran los tratamientos 2, 4, 3 y 1 que se comportan de forma similar en la planta, demostrando que los cuatro ejercen una influencia positiva en el crecimiento de las plántulas de lechuga.

Tabla 16.

Análisis de varianza para el ABC de altura, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media de ABC altura \pm sd
T2	1154,84 \pm 44,90 a
T4	1149,78 \pm 81,52 a
T3	1083,62 \pm 26,07 a
T1	1014,17 \pm 117,39 ab
T5	846,49 \pm 121,88 b

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2.1.2 Grosor del tallo

El análisis estadístico de varianza para el ABC del grosor de tallo se muestra en el Anexo 3.2, presenta un valor de F de 2,36 y un p-valor de 0,1238 por lo que se

acepta la hipótesis nula, demostrando que ninguno de los tratamientos presenta diferencia significativa en el grosor del tallo de las plántulas.

3.2.1.3 Porcentaje de germinación

El análisis estadístico de varianza para el porcentaje de germinación se muestra en el Anexo 3.3. Se determinó un valor F de 5,00 y un p-valor de 0,0178 demostrando que al menos unos de los tratamientos presentan una diferencia significativa incidiendo positivamente en el porcentaje de germinación de las plántulas de lechuga.

En la prueba Tukey al 5 % se distinguen dos grupos A y B como se muestran en la Tabla 17. Los tratamientos del grupo A se comportan de igual forma en la planta influyendo positivamente en el porcentaje de germinación, sin embargo, los tratamientos 2 y 4 destacan al tener la media más alta comparada con el testigo.

Tabla 17.

Análisis de varianza para el porcentaje de germinación, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media de porcentaje de germinación \pm sd
T2	85,70 \pm 0,90 a
T4	83,14 \pm 3,60 a
T3	80,47 \pm 2,85 ab
T1	79,78 \pm 5,21 ab
T5	69,53 \pm 8,05 b

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2.1.4 Eficiencia fotosintética (Fv/m)

En el Anexo 3.4 se muestra el análisis estadístico de varianza para el Fv/m de la variable eficiencia fotosintética, se presenta un valor F de 3,92 y un p-valor de 0,0363, demostrando que al menos uno de los tratamientos presenta diferencia significativa.

En la Tabla 18 se muestra el análisis Fv/m para la eficiencia fotosintética. Se observan dos grupos diferenciados A y B. En el primer grupo A se encuentran los tratamientos 3, 2 y 4 demostrando que estos influyen de manera positiva en el valor Fv/m al compararse con el testigo.

Tabla 18.

Análisis de varianza para la eficiencia fotosintética Fv/m, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media de Fv/m \pm sd
T3	0,77 a
T2	0,75 ab
T4	0,74 ab
T1	0,73 b
T5	0,72 b

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2.1.5 Materia seca

El análisis estadístico de varianza se muestra en el Anexo 3.5, donde se obtuvo un valor F de 25,57 y un p-valor de 0,0001 demostrando que al menos uno de los tratamientos presenta diferencia altamente significativa en el contenido de materia seca de la parte aérea de la planta.

En la Tabla 19 se muestra el análisis para la prueba Tukey al 5 %. Se presentan tres grupos diferenciados A, B y C. En el grupo A se encuentran los tratamientos 4, 3 y 2, que presentan la mayor influencia en el contenido de materia seca de la plántula en comparación con los tratamientos de los otros grupos. Mientras que los tratamientos

del grupo B también incrementan el contenido de materia seca, pero en menor proporción que los tratamientos del grupo A.

Tabla 19.

Análisis de varianza para la materia seca, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media de materia seca (g) \pm sd
T4	0,11 \pm 0,002 a
T3	0,09 \pm 0,01 ab
T2	0,09 \pm 0,01 ab
T1	0,08 \pm 0,002 b
T5	0,05 \pm 0,005 c

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2.1.6 Longitud de la raíz

El análisis estadístico de varianza se muestra en el Anexo 3.6 para la longitud de la raíz, con un valor F de 148,08 y un p-valor de 0,0001 determinando que hay una diferencia altamente significativa en al menos uno de los tratamientos evaluados.

En la Tabla 20 se muestra la prueba Tukey al 5 % que demostró dos grupos diferenciados A y B. Todos los tratamientos del grupo A presentan influencia en la longitud de la raíz a diferencia del testigo.

Tabla 20.

Análisis de varianza para la longitud de la raíz, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media de longitud de la raíz (mm) \pm sd
T4	59,75 \pm 3,17 a
T3	58,73 \pm 4,20 a
T2	58,73 \pm 4,20 a
T1	54,18 \pm 2,19 ab
T5	47,67 \pm 4,34 b

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2.1.7 Peso de la raíz

En el Anexo 3.7 se muestra el análisis estadístico de varianza para el peso de la raíz obteniendo un valor F de 5,52 y un p-valor de 0,0131 demostrando que al menos uno de los tratamientos presenta diferencia significativa.

En la Tabla 21 se muestra en análisis Tukey al 5 % en donde se observa la formación de tres grupos diferenciados. En el grupo A se encuentra el tratamiento 4 siendo el mejor al no compartir letra con otro tratamiento. En el grupo B se encuentran los tratamientos 3 y 2 que se comportan de manera similar. Y en el grupo C se encuentran los tratamientos 1 y 5 los cuales no influyen en el peso de la raíz

Tabla 21.

Análisis de varianza para el peso de la raíz, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media de peso de la raíz (g) \pm sd
T4	0,28 \pm 0,017 a
T3	0,23 \pm 0,019 b
T2	0,23 \pm 0,019 b
T1	0,06 \pm 0,002 c
T5	0,04 \pm 0,015 c

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2.2 Especie brócoli

3.2.2.1 Altura

El análisis estadístico de varianza para el ABC de la variable altura se puede observar en el Anexo 4.1. El valor F de 6,84 y un p-valor de 0,0064 indicando de esta forma que al menos uno de los tratamientos aplicados tiene una diferencia altamente significativa en la altura de las plántulas de brócoli.

En la Tabla 22 se puede observar tres grupos diferenciados A, B y C para la prueba Tukey al 5 %. El análisis estadístico muestra que los tratamientos 2, 4, y 1 se encuentran en el primer grupo con las medias más altas. El grupo B también ejerce influencia en la altura de la planta, pero en menor proporción que el grupo A. Finalmente se encuentra el tratamiento 5 en el grupo C sin producir efectos en la altura de las plántulas.

Tabla 22.

Análisis de varianza para el ABC de altura, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media de ABC altura \pm sd
T2	1630,31 \pm 72,367 a
T4	1596,12 \pm 49,947 ab
T1	1539,73 \pm 106,557 abc
T3	1424,49 \pm 12,536 bc
T5	1406,60 \pm 53,465 c

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2.2.2 Grosor del tallo

En el Anexo 4.2 se muestra el análisis estadístico de varianza para el ABC de la variable ancho en donde se determinó un valor de F de 14,5 y un p-valor de 0,0004 demostrando que al menos unos de los tratamientos presentan una diferencia altamente significativa por lo tanto produce un incremento favorable en el grosor del tallo de la plántula.

En la Tabla 23 para la prueba Tukey al 5 % se revelaron dos grupos diferenciados, A y B. Los tratamientos del grupo A tienen un efecto positivo para el grosor del tallo de las plántulas. Mientras que los tratamientos del grupo B no producen efectos positivos en el grosor del tallo de las plantas de brócoli.

Tabla 23.

Análisis de varianza para el ABC del grosor del tallo, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media de ABC grosor \pm sd
T2	21,23 \pm 1,842 a
T4	20,55 \pm 0,579 a
T1	19,39 \pm 0,577 a
T3	15,01 \pm 2,415 b
T5	14,40 \pm 0,769 b

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2.2.3 Porcentaje de germinación

En el Anexo 4.3 se muestra el análisis estadístico de varianza para el porcentaje de germinación, obteniendo un valor F de 2,42 y un p-valor de 0,1171 demostrando que ninguno de los tratamientos presenta diferencia significativa.

3.2.2.4 Eficiencia fotosintética (Fv/m)

El análisis estadístico de varianza para el Fv/m de la eficiencia fotosintética se muestra en el Anexo 4.4 donde se obtuvo un valor de F de 1,29 y un p-valor de 0,3367 demostrando que ninguno de los tratamientos presenta una diferencia significativa para la eficiencia fotosintética.

3.2.2.5 Materia seca

El análisis estadístico de varianza se muestra en el Anexo 4.5, con un valor de F de 6,95 y un p-valor de 0,0061 determinan que al menos uno de los tratamientos presenta diferencia significativa, influyendo en el contenido de materia seca de la parte aérea de la plántula.

La prueba Tukey al 5 % se muestra en la Tabla 24 donde se presentan tres grupos diferenciados: A, B y C. En el grupo A se encuentran los tratamientos 2, 4 y 3, los cuales influyen positivamente en el contenido de materia seca de las plántulas. Los tratamientos del grupo B influyen de manera positiva en la materia seca en menor proporción que los tratamientos del grupo A, diferenciándose claramente del testigo.

Tabla 24.

Análisis de varianza para la materia seca, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media de materia seca (g) \pm sd
T2	0,13 \pm 0,003 a
T4	0,11 \pm 0,046 ab
T3	0,09 \pm 0,005 abc
T1	0,07 \pm 0,004 bc
T5	0,05 \pm 0,001 c

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2.2.6 Longitud de la raíz

En el Anexo 4.6 se muestra el análisis estadístico de varianza para la variable longitud de la raíz, donde se obtuvo un valor F de 13,52 y un p-valor de 0,0005 indicando que al menos uno de los tratamientos presenta diferencia altamente significativa para la longitud de la raíz.

El análisis Tukey al 5 % se muestra en la Tabla 25, se forman dos grupos diferenciados A y B. El grupo A está formado por los tratamientos 4 y 2, que se comportan de manera similar en la planta influyendo positivamente en la longitud de la raíz. El grupo B formado por los tratamientos 3, 1 y 5 presentan baja o nula influencia sobre la longitud de la raíz.

Tabla 25.

Análisis de varianza para la longitud de la raíz, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media de longitud de la raíz (mm) \pm sd
T4	92,70 \pm 5,971 a
T2	92,18 \pm 1,606 a
T3	81,69 \pm 0,451 b
T1	80,66 \pm 0,186 b
T5	77,13 \pm 4,206 b

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2.2.7 Peso de la raíz

En el Anexo 4.7 se observa el análisis estadístico de varianza del peso de la raíz, con un valor F de 9,65 y un p-valor de 0,0018 demostrando que al menos uno de los tratamientos presenta diferencia altamente significativa

La prueba Tukey al 5 % para el peso de la raíz se muestran en la Tabla 26. Se distinguen tres grupos diferenciados A, B y C en el grupo A se encuentran los tratamientos 4 y 2 que producen un incremento en el peso de la raíz demostrando tener un comportamiento similar en las plántulas. En el grupo B se encuentran los tratamientos 2, 1 y 3 con una menor influencia en el aumento del peso de la raíz, y el nivel C formado por los tratamientos 1, 3 y 5 con baja o nula influencia en el peso de la raíz.

Tabla 26.

Análisis de varianza para el peso de la raíz, prueba Tukey al 5 %

Tratamiento	Media del peso de la raíz (g) \pm sd
T4	0,21 \pm 0,016 a
T2	0,20 \pm 0,005 ab
T1	0,17 \pm 0,019 bc
T3	0,17 \pm 0,014 bc
T5	0,15 \pm 0,008 c

Nota: Medias en la misma columna con una letra común no son significativamente diferentes, según la prueba de Tukey ($p > 0,05$), los datos corresponden a la media de tres repeticiones.
Elaborado por: las autoras, 2019.

Los datos obtenidos en la fase de campo fueron comparados bibliográficamente pudiendo destacar lo siguiente: En la investigación realizada por Prado (2013), en la que utilizaron extractos bacterianos de AIA, se concluye que hay una diferencia en el crecimiento de la planta, obteniendo un 25,87 % más de altura que las plantas testigo, pudiendo compararse con los resultados obtenidos en la presente investigación, en donde se obtuvo un 13,72 % más de crecimiento de la planta en comparación con las plantas testigo para la especie brócoli y 2,7 % más de altura para la especie lechuga. Se ha encontrado que la producción de AIA por PGPR promueve el desarrollo radical y vegetativo en plántulas de lechuga, esto se traduce en mayor altura para las plántulas (Martínez et al., 2013).

Restrepo et al. (2015), menciona que se han encontrado efectos positivos en el crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays* L.) y col común (*Brassica oleracea* L.) al aplicar biopreparados con cepas PGPR de *Burkholderia unamae* y *Bacillus subtilis*. Además Vivanco et al. (2016), mencionan otras bacterias capaces de producir AIA y aumentar el crecimiento de las plantas, entre las que se encuentran cepas de *G.*

diazotrophicus, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas* sp. y *Bacillus amyololiquefaciens*. Estudios en los cuales se han inoculado cepas de *Bacillus subtilis* en plantas de tomate, calabacita, pimentón y cebolla han registrado un incremento en las longitudes de los tallos, debido a los mecanismos de solubilización de fosfatos, al antagonismo frente a fitopatógenos y a la capacidad de producir AIA (C. Rodríguez, 2013). Al inocular las plántulas con PGPR's estas aumentan su longitud y grosor proporcionalmente debido a que las bacterias que se asocian a la raíz producen fitohormonas como AIA, incrementan la fijación de nitrógeno y la solubilización de fosfatos (Vivanco et al., 2016).

En lechuga se produce una influencia positiva en el porcentaje de germinación de las semillas en los tratamientos que tienen las cepas en estudio, esto debido a la capacidad de promoción de crecimiento vegetal de las cepas usadas. En el análisis realizado por Venner & Martin (2009), entre las cepas que produjeron un mayor índice de germinación relativo en semillas de uchuva se encuentran cepas de *Bacillus* sp. y *Bacillus cereus*. Además León (2014), determinó que en plantas de maíz las bacterias nativas incrementaron el porcentaje de germinación debido a la producción bacteriana de sustancias estimuladoras de crecimiento que promueven la síntesis de enzimas hidrolíticas en el endospermo, es decir se da la activación de procesos metabólicos en las semillas por el aumento de la disponibilidad de almidón. En brócoli no se observó diferencia entre el testigo y el resto de los tratamientos, sin embargo, los porcentajes de germinación son altos posiblemente por la certificación de las semillas comerciales usadas.

En lechuga, se produjo un incremento en la eficiencia fotosintética con la aplicación de los tratamientos, en especial el tratamiento 3 que consta de una aplicación de *Bacillus megaterium*. La evaluación del fotosistema II (PSII) es necesaria para

determinar la eficiencia en la captación de energía lumínica de las plantas bajo un estrés biótico, la disminución en la relación F_v/m indica una baja eficiencia fotoquímica del PSII, si esta relación se encuentra entre 0,75 y 0,86 quiere decir que el PSII se encuentra en perfectas condiciones y no presenta estrés (Melo, Souza, & Cunha, 2017), con lo que se puede decir que las plántulas de lechuga a las que se aplicó los tratamientos 3 y 2 presentaron un buen funcionamiento del PSII. Además, González et al. (2018), afirma que las condiciones del PSII mejoran porque al inocular las plantas con PGPR aumenta el contenido de clorofila y por lo tanto la captación de CO_2 . En las plántulas de brócoli no se observó diferencia significativa, es decir todos los tratamientos se comportaron de la misma forma en el funcionamiento del PSII, esto se debe a que las plantas de brócoli necesitan una mayor cantidad de sales minerales y otros requerimientos para mantener el buen funcionamiento del PSII (Masache & Meneses, 2018).

Para las dos especies hortícolas estudiadas se observó un incremento de materia seca con respecto a las plantas testigo, se puede dar gracias a la capacidad que tienen las cepas aplicadas para solubilizar compuestos poco móviles del suelo, como los fosfatos, mejorando así el ingreso de este macronutriente a la planta, lo que se traduce en una mayor cantidad de biomasa (Hernandez & Escalona, 2003). En la investigación realizada por Peña & Reyes (2007), en la cual se inoculó con cepas bacterianas a semillas de lechuga, se observó que se incrementó significativamente el peso seco de la planta en relación al testigo no inoculado, obteniendo hasta 60 mg/plántula de peso seco, esto debido a la producción de AIA y su actuación como PGPR. Sánchez, García, Romero, & Bonilla (2014), evaluaron consorcios de cepas bacterianas en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) obteniendo un 102 % más de materia seca en comparación

con un tratamiento químico, debido a la mayor nutrición que tiene las plántulas por el crecimiento de sus raíces.

Tanto en brócoli como en lechuga se presentó un mayor peso y longitud de la raíz en comparación con el testigo, Venner & Martin (2009), en su investigación encontraron que cepas de *Bacillus* sp. presentaron raíces de hasta un 60 % más de longitud que las raíces de las plántulas control. Sarmiento (2014), demostró la capacidad de *B. circulans* para aumentar el desarrollo radical de arabisopsis u oruga (*A. thaliana*) mediante la comparación de plántulas en biorreactor con la cepa y plántulas expuestas únicamente a AIA. Las plantas de biorreactor con la cepa mostraron un crecimiento radical de 13,7 mm y las que tiene únicamente AIA solamente crecieron 5,7 mm. Esto se da porque el medio de cultivo del biorreactor contenía triptófano por lo que se da una constante producción de AIA por parte de la cepa, lo que estimula la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas.

La inoculación con bacterias puede mejorar el desarrollo radical de las plantas incrementando la capacidad de absorción de agua y nutrientes de los cultivos mediante la producción de reguladores de crecimiento que se encuentran asociados a la interface de las raíces, sin embargo la eficiencia de los microorganismos se puede ver afectada por algunas condiciones bióticas, como las respuestas sinérgicas antagónicas o el estado fenológico de la planta (Sánchez et al., 2014).

Conclusiones

- Mediante las pruebas de laboratorio se concluyó que las cepas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus megaterium* tuvieron una mejor respuesta como PGPR ya que las dos cepas tienen la capacidad de fijar nitrógeno, producir auxinas y solubilizar fosfatos en altas concentraciones.
- Los tratamientos a base de *B. licheniformis* y de *B. megaterium* con aplicaciones semanales influyó significativamente en la altura de las plántulas de lechuga.
- Las dos cepas de *Bacillus* en aplicaciones semanales ayudaron al desarrollo en altura y grosor de las plántulas de brócoli en comparación con el testigo.
- Los tratamientos que consistieron en aplicaciones semanales de los biopreparados a base de *B. licheniformis* y de *B. megaterium* incrementaron el porcentaje de germinación de las semillas de lechuga.
- El tratamiento de una sola aplicación después de la siembra a base de *B. megaterium* influyó positivamente en las condiciones del fotosistema II de las plántulas de lechuga.
- Las aplicaciones semanales del tratamiento a base de *B. megaterium* incrementa el contenido de materia seca en plántulas de lechuga, mientras que en plántulas de brócoli incrementa el contenido de materia seca el tratamiento de aplicaciones semanales a base de *B. licheniformis*.
- El peso y la longitud de la raíz aumentó significativamente en comparación con el testigo, en los tratamientos de aplicaciones semanales de *B. licheniformis* y de *B. megaterium* para las dos especies hortícolas estudiadas.

Recomendaciones

- Aplicar semanalmente los biopreparados a base de *B. licheniformis* y de *B. megaterium* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL para la actuación de las cepas como PGPR.
- Realizar investigaciones de estas cepas bacterianas en plantas de siembra directa para analizar su persistencia en el tiempo.
- Realizar pruebas en biorreactor de las cepas de *B. licheniformis* y de *B. megaterium* estableciendo diferentes condiciones de cultivo para potenciar la capacidad de producción de AIA.
- Evaluar consorcios bacterianos con cepas que tengan distintos beneficios para los cultivos como antagonismo frente a patógenos, PGPR y producción de sideróforos.

Referencias

- Arteaga, M. (2011). *Aclimatación de 12 híbridos de brócoli (Brassica oleracea L. Var. Itálica) en el cantón Riobamba provincia de Chimborazo* (Tesis de fin de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Baca, K., Sánchez, M., Cerreño, C., & Mendoza, G. (2010). Polihidroxialcanoatos de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 213–224. doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jai.12446>
- Bautista, L., & Gallardo, I. (2008). *Estandarización de métodos de detección para promotores de crecimiento vegetal (ácido indol acético y giberelinas) en cultivos microbianos* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Bobadilla, C., & Rincón, S. (2008). *Aislamiento y producción de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos de plaza* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Caicedo, S., & Chacón, J. (2017). *Pruebas bajo invernadero de cepas de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de Alternaria spp. en Brassica oleracea var italica y técnicas de conservación de cepas* (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Camelo, M., Vera, P., & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159–166. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/4499/449945031010/>

- Cancino, I. (2017). *Efecto de actinobacterias aisladas de Asparagus officinalis L. en el desarrollo vegetativo de Lycopersicon esculentum Mill* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Cazorla, A. (2010). *Estudio bioagronómico de catorce cultivares de lechuga tipo mantecosa (Lactuca sativa L.) en el cantón Riobamba, provincia de Chimborazo* (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Cervantes, A., & Marques, M. (2007). *Diseño de Experimentos. Curso Práctico* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Irapuato, México.
- Chávez, L., Hernández, A., Cabrera, J., Luna, L., & Pacheco, J. (2016). Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* spp. (Cactaceae). *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 333–341. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.001>
- Collaguazo, L., & Tenorio, M. (2018). *Elaboración de biopreparados a base de Bacillus sp. para controlar Alternaria spp. en el cultivo de Brassica oleracea var. italica* (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Corrales, L., Arévalo, Z., & Moreno, V. (2014). Solubilización de fosfatos : una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *Nova*, 12(21), 67–79. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v12n21/v12n21a06.pdf>
- Corrales, L., Sánchez, L., Arévalo, Z., & Moreno, V. (2014). *Bacillus*: a genus of bacteria that exhibits important phosphate solubilizing abilities. *Nova*, 12(22), 165–178. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v12n22/v12n22a06.pdf>

- Corrales, P. (2017). *Programación de riego para los híbridos domador y avenger de brócoli (Brassica oleracea var. Itálica)* (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Correa, O. (2016). *Aportes de la microbiología a la producción de los cultivos*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Facultad de Agronomía
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, Colombia.
- Delgado, E. (2016). *Evaluación de tres variedades de lechuga (Lactuca scariola L.) con tres dosis de fitohormonas y quelatos inorgánicos y orgánicos cultivadas en condiciones de hidroponía* (Tesis de pregrado). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Elmaghraby, I., Carimi, F., Sharaf, A., Marei, M., & Hammad, M. (2015). Isolation and identification of *Bacillus megaterium* Bacteriophages via AFLP Technique. *Current Research in Bacteriology*, 8(4), 77–89. doi: <https://doi.org/10.3923/crb.2015.77.89>
- Espinosa de los Monteros, J. (2005). *Caracterización del proceso de crecimiento de Bacillus subtilis bajo condiciones anaerobias* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México.
- González, G., Espinosa, B., Cano, P., Moreno, A., Leos, L., Sánchez, H., & Sáenz, J. (2018). Influencia de rizobacterias en la producción y calidad nutracéutica de tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(2), 367–379. Recuperado de

<http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v9n2/2007-0934-remexca-9-02-367.pdf>

Gonzalez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos lignocelulósicos de Higuierilla (Ricinus communis)* (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Manizales, Manizales, Colombia.

González, H., & Fuentes, N. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(1), 17. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173401.60>

Guamán, A. (2017). *Efecto de a aplicación de tres bioformulados en el desarrollo de 2 variedades de lechuga (Lactuca sativa L.) Var. Coolguard y Gentilina a campo abierto, en el cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo* (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

Guato, C. (2015). *Evaluación del efecto del compost generado en la empresa publica mancomunada de aseo integral Patate- Pelileo "EMMAIT-EP" en la producción limpia, en el rendimiento de dos variedades de lechuga (Lactuca sativa)* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.

Guillén, R., Hernández, F., Gallegos, G., Rodríguez, R., Aguilar, C., & Reyes, M. (2006). *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(2), 105–114. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224204>

Gutiérrez, Y. (2016). *Elaboración de un dip vegetal a partir de sub - productos de brócoli (Brassica oleracea var. Italica) y zanahoria (Daucus carota), como*

- alternativa para el consumo*. (Tesis de pregrado). Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Guzman, E. (2011). *Aislamiento y caracterización de bacterias solubilizadoras de fósforo a partir de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo* (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Hernandez, L., & Escalona, M. (2003). Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*, 29–32. <https://doi.org/10.1164/rccm.200210-1148OC>
- Jimenez, E., & Gómez, J. (2012). Identificación y descripción de síntomas de los principales patógenos asociados al cultivo de marañón (*Anacardium occidentale* L.) orgánico y convencional, en León, Nicaragua. *La Calera*, (12), 1–8. Recuperado de <http://repositorio.una.edu.ni/2378/1/pph20j61ide.pdf>
- Labra, M. (2012). *Ganancia genética y respuesta a fertilización de origen mineral y biológica (PGPR) de trigos chilenos (Triticum aestivum L.), liberados con posterioridad a la revolución verde* (Tesis de magister). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- León, L. (2014). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de las enterobacterias aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.). *Scientia Agropecuaria*, 5, 177–185. doi: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.04.02>
- Leopold, C. (1960). *Auxins and Plant Growth*. London, England: University of California Press.
- López, H. (2017). *Aplicación de mulch, Bacillus sp. y Trichoderma spp. para el*

- control de mildiu veloso (Bremia lactucae) en el cultivo de lechuga (Lactuca sativa)*. (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. yoko ono) en período de enraizamiento* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Martínez, L., Peniche, R., Iturriaga, M., Medrano, S., & Pacheco, J. (2013). Caracterización de rizobacterias aisladas de tomate y su efecto en el crecimiento de tomate y pimiento. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 36(1), 63–69. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000100007
- Masache, E., & Meneses, J. (2018). *Evaluación de la eficiencia fotosintética en el cultivo in vitro de Brassica oleracea var. Italica* (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1–20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2015.03.045>
- Melo, H., Souza, E., & Cunha, J. (2017). Fluorescence of chlorophyll a and photosynthetic pigments in *Atriplex nummularia* under abiotic stresses. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 21(4), 232–237. doi: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n4p232-237>
- Molina, D., Morales, Y., Bustillos, M., Rodríguez, O., Saenz, Y., Muñoz, J., & Castañeda, M. (2015). Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 17 (2), 24–34. Recuperado de

https://www.researchgate.net/publication/293086504_Mecanismos_de_fitostimulacion_por_rizobacterias_aislamientos_en_America_y_potencial_biotecnologico/download

Monge, M., & Alvarez, X. (2006). *Proyecto de factibilidad para la creación de una empresa productora procesadora y comercializadora de brócoli ubicada en la Provincia de Cotopaxi* (Tesis de pregrado), Latacunga, Ecuador.

Montalvo, F. (2014). *Evaluación de cuatro distanciamientos de siembra en el desarrollo y producción de dos variedades del brócoli (Brassica oleracea L.) en el cantón Ibarra provincia de Imbabura* (Tesis de grado). Universidad Técnica de Babahoyo, Carchi, Ecuador.

Montiel, C., Gómez, B., & Veloz, R. (2017). Efecto de las bacterias de suelo de bosque benéficas para plantas. *Jóvenes en la ciencia*, 2 (1), 943–947. Recuperado a partir de <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/2191/1685>

Mota, L. (2013). *Utilización de un medio enriquecido con melazas para la producción de biomasa de Bacillus licheniformis con potencial biofertilizante* (Tesis de posgrado). Universidad Tecnológica de la Mixteca, Oaxaca, México.

Muñoz, D. (2017). *Bacterias promotoras del crecimiento vegetal: Mecanismos y aplicaciones* (Trabajo de grado). Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

Murphy, J., & Riley, J. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Architecture, Materiality and Society: Connecting Sociology of Architecture with Science and Technology Studies*, 27, 31–36. <https://doi.org/10.1057/9781137461131>

- Navarro, J. (2010). *Repositorio de la Universidad de Chile. La técnica del área bajo la curva*. Chile.: Kerwa Repositorio. Recuperado de <http://www.kerwa.ucr.ac.cr/>
- Obando, M. (2013). *Proyecto “Apoyo a la producción de semillas de granos básicos para la seguridad alimentaria de Nicaragua”*. Nicaragua. Recuperado de http://www.inta.gob.ni/biblioteca/images/pdf/manuales_catalogos/EVALUACION CALIDAD DE SEMILLAS.pdf
- Orozco, S., & Jiménez, R. (2016). *Caracterización de la cadena productiva del cultivo de brócoli en la región de las Verapaces y Chimaltenango* (1° ed.). Guatemala: Manual técnico CATIE. Recuperado a partir de <http://hdl.handle.net/11554/8422>
- Peña, H., & Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia*, 32(8), 560–565. Recuperado a partir de <https://www.redalyc.org/pdf/339/33932811.pdf>
- Posada, L. (2017). *Promoción de crecimiento vegetal de Bacillus subtilis EA-CB0575, colonización rizosférica y potencial genómico y bioquímico* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Prado, A. (2013). *Optimización de la producción de AIA por bacterias promotoras de crecimiento y evaluación de su efectividad biológica en papa (Solanum tuberosum var. Alpha)* (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México.
- Ramírez, R., Camacho, A., Reyes, G., & Esquivel, R. (2015). *Técnicas básicas de microbiología y su fundamento*. México: Trillas.
- Ramos, B. (2015). *Aislamiento y caracterización de PGPR's de mezquite (Prosopis*

- spp.) (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, México.
- Reinoso, Y., Casadesús, L., García, A., Gutiérrez, J., & Pazos, V. (2006). Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*, 10(3), 187–191. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116108001>
- Restrepo, G., Marulanda, S., de la Fe, Y., Díaz, A., Lucia, V., & Hernández, A. (2015). Bacterias solubilizadoras de fosfato y sus potencialidades de uso en la promoción del crecimiento de cultivos de importancia económica. *Revista CENIC Ciencias Biologicas*, 46(1), 63–76. Recuperado a partir de <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=108658147&lang=es&site=eds-live>
- Rodríguez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos lignocelulósicos de higerilla (Ricinus communis)* (Tesis de grado). Universidad Católica de Manizales, Manizales, Colombia.
- Rodríguez, O., Aguilera, I., & Pérez, R. (2013). Adecuación de un micrométodo colorimétrico para la cuantificación de fósforo soluble en cultivos microbianos. *Revista Cubana de Química*, 25(1), 3–8. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/4435/443543730001.pdf>
- Sagardoy, M., & Mandolesi, M. (2004). *Biología del Suelo*. Recuperado a partir de [https://books.google.com.ec/books?id=Uvg75tgmWoC&pg=PA42&dq=microorganismos+del+suelo&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjT7oqJgMbdAhUMrVMKHSGDCXoQ6AEIKjAB#v=onepage&q=microorganismos del suelo&f=true](https://books.google.com.ec/books?id=Uvg75tgmWoC&pg=PA42&dq=microorganismos+del+suelo&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjT7oqJgMbdAhUMrVMKHSGDCXoQ6AEIKjAB#v=onepage&q=microorganismos%20del%20suelo&f=true)

- Sánchez, B. (2013). *Respuesta del brócoli (Brassica oleracea var. Italica) híbrido fantástico a la fertilización con cinco fuentes de azufre aplicadas a dos dosis. Mulaló, Cotopaxi* (Tesis de Grado). Universidad Central del Ecuador, Riobamba, Ecuador.
- Sánchez, B., García, A., Romero, A., & Bonilla, R. (2014). Efecto de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal solubilizadoras de fosfato en *Lactuca sativa* cultivar White Boston. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 122–128. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.41077>
- Sánchez, D., & Pérez, J. (2018). Caracterización y evaluación de PGPR's sobre el crecimiento de plántulas de *Dioscorea rotundata* in vitro. *Agronomía Costarricense*, 42(2), 75–91. <https://doi.org/10.15517/rac.v42i2.33780>
- Sanclemente, M. A., & Enrique, P. (2008). Crecimiento y eficiencia fotosintética de *Ludwigia decurrens* walter (onagraceae) bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. *Acta Biológica Colombiana.*, 13(1), 175–186. [https://doi.org/10.1016/S0040-6090\(03\)00412-7](https://doi.org/10.1016/S0040-6090(03)00412-7)
- Sarmiento, L. (2014). *Bacillus circulans E9 productora de ácido indol acético en un medio de cultivo de bajo costo a nivel de biorreactor* (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, México.
- Shukor, M., & Syed, M. (2010). Microbiological reduction of hexavalent molybdenum to molybdenum blue. En A. Méndez (Ed.), *Curret Reasearch, Technology and education topicsin applied microbiology and microbial biotechnology* (pp. 1304–1310). Formatex Research Center. Recuperado a partir de <http://www.formatex.info/microbiology2/1304-1310.pdf>
- Simbaña, E. (2015). *Estudio del rendimiento de cuatro hortalizas producidas a partir*

de semillas de producción artesanal vs. semillas importadas, en las localidades de Tumbaco- Pichincha y José Guango bajo- Cotopaxi, 2013. (Tesis de Grado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. (2013). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357–364. Recuperado a partir de http://www.mag.go.cr/rev_meso/v24n02_357.pdf

Tejera, B., Rojas, M. M., & Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biologicas*, 42(3), 131–138. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>

Tortoló, K., & Bell, A. (2015). Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus megaterium*: estado del arte. *ICIDCA Sobre los derivados de la Caña de Azúcar*, 49(1), 22–26. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223136961004>

Vallejo, J. (2013). *Elaboración de un manual guía técnico práctico del cultivo de hortalizas de mayor importancia socio-económica de la región interandina* (Tesis de grado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.

Vary, P., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W., & Jahn, D. (2007). *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 957–967. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1089-3>

Venner, C., & Martin, M. J. (2009). *Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana,

Bogotá, Colombia.

- Villarreal, M. F., Villa, E., Cira, L., Estrada, M. I., Parra, F., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Vivanco, R., Molina, D., Morales, Y., Quintero, V., Munive, A., & Muñoz, J. (2016). Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias*, 1, 9–19. Recuperado a partir de https://www.researchgate.net/publication/307540839_Reto_agrobiotecnologico_inoculantes_bacterianos_de_segunda_generacion
- Wong, E. (2010). ¿Después de un análisis de variancia...qué? Ejemplos en ciencia de alimentos. *Agronomía Mesoamericana*, 21(2), 349–356. Recuperado a partir de http://www.mag.go.cr/rev_meso/v21n02_349.pdf
- Zocorro, G. (2015). *Efecto de diferentes tipos de sustrato de almidón sobre la cinética de crecimiento de Bacillus licheniformis* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Zuñiga, O. (2009). *Crecimiento de Bacillus pumilus productor de la auxina AIA, como base para formular un biofertilizante*. (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Perú.

Anexos

Anexo 1. Medios de cultivo

1.1 Composición medio NFB

Compuesto	Cantidad (g)
Ácido málico	5
K ₂ HPO ₄	0,5
EDTA Fe y Na	0,01
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,001
MnSO ₄ . 2 H ₂ O	0,002
MgSO ₄ H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,026
Biotina	0,0001
Agar	2
Azul de bromotimol	0,0375
Agua destilada	1 L

Elaborado por: las autoras, 2019.

1.2 Composición medio Pikovskaya.

Compuesto	Cantidad (g)
Glucosa	10,0
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5,0
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	5,0
KCl	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0001
FeSO_4	0,0001
Extracto de levadura	0,5
Agar	15,0
Purpura de bromocresol	0,1
Agua destilada	1 L

Elaborado por: las autoras, 2019.

1.3 Composición medio NBRIP

Compuesto	Cantidad (g)
GLucosa	10,0
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5,0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	5,0
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0,1
KCl	0,2
Agua destilada	1 L

Elaborado por: las autoras, 2019.

Anexo 2. Tablas ANOVA fase de laboratorio

2.1 Análisis de varianza para la concentración de AIA producido por las cepas de *Bacillus* spp.

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F.V	SC	GL	CM	F	p-valor
Cepa	171,27	5	34,25	376,15	< 0,0001
Error	1,09	12	0,09		
Total	172,36	17			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

2.2 Análisis de varianza para el índice de solubilización a las 24 horas de las cepas de *Bacillus* spp.

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F.V	SC	GL	CM	F	p-valor
Cepa	15,43	6	2,57	149,97	< 0,0001
Error	0,24	14	0,02		
Total	15,67	20			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

2.3 Análisis de varianza para el índice de solubilización a las 48 horas de las cepas de *Bacillus* spp.

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F.V	SC	GL	CM	F	p-valor
Cepa	17,09	6	2,85	81,95	< 0,0001
Error	0,49	14	0,03		
Total	17,58	20			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

2.4 Análisis de varianza para la concentración de fosfatos solubilizados por las cepas de *Bacillus* spp.

Análisis de varianza (SC tipo III)					
F.V	SC	GL	CM	F	p-valor
Cepa	3647,80	5	729,56	493,64	< 0,0001
Error	17,74	12	1,48		
Total	3665,54	17			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

Anexo 3. Tablas ANOVA fase de campo, especie lechuga

3.1 Análisis de varianza del ABC para la variable altura.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	194335,60	48583,90	6,40	0,0081
Error	10	75952,20	7595,22		
Total	14	270287,80			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

3.2 Análisis de varianza del ABC para la variable grosor.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	135,17	33,79	2,36	0,1238
Error	10	143,48	14,34		
Total	14	287,54			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

3.3 Análisis de varianza para el porcentaje de germinación.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	455,71	113,93	5,00	0,0178
Error	10	227,87	22,79		
Total	14	683,59			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

3.4 Análisis de varianza de Fv/m para la eficiencia fotosintética.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	0,0041	0,001	3,92	0,0363
Error	10	0,0026	0,00026		
Total	14	0,01			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

3.5 Análisis de varianza para la materia seca.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	0,0048	0,0012	27,57	<0,0001
Error	10	0,0043	0,000043		
Total	14	0,01			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

3.6 Análisis de varianza para la longitud de la raíz.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	304,23	76,06	5,52	0,0131
Error	10	137,89	13,79		
Total	14	442,12			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

3.7 Análisis de varianza para el peso de la raíz.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	0,015	0,04	148,08	<0,0001
Error	10	0,0025	0,00025		
Total	14	0,15			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

Anexo 4. Tablas ANOVA fase de campo, especie brócoli

4.1 Análisis de varianza del ABC para la variable altura.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	120992,52	30248,13	6,84	0,0064
Error	10	44202,55	4420,25		
Total	14	165195,07			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

4.2 Análisis de varianza del ABC para la variable grosor.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	122,08	30,52	14,53	0,0004
Error	10	21,01	2,10		
Total	14	143,08			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

4.3 Análisis de varianza para el porcentaje de germinación.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	55,44	13,86	2,42	0,1171
Error	10	57,25	5,72		
Total	14	112,69			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

4.4. Análisis de varianza para el Fv/m de la eficiencia fotosintética.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	0,0042	0,001	1,29	0,3367
Error	10	0,01	0,0081		
Total	14	0,01			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

4.5 Análisis de varianza para la materia seca.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	0,01	0,003	6,95	0,0061
Error	10	0,0043	0,00043		
Total	14	0,02			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

4.6 Análisis de varianza para la longitud de la raíz.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	607,30	151,83	13,52	0,0005
Error	10	112,34	11,23		
Total	14	719,64			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por: las autoras, 2019.

4.7 Análisis de varianza para el peso de la raíz.

Análisis de varianza					
F.V	GL	SC	CM	F	p-valor
Tratamiento	4	0,01	0,0018	9,65	0,0018
Error	10	0,0019	0,0019		
Total	14	0,01			

Nota: SC: suma de cuadrado; GL: grados de libertad; CM: Media de cuadrados; F: estadístico; P: probabilidad.

Elaborado por. Las autoras, 2019.

Anexo 5. Fase de laboratorio



Figura 11. Soluciones estándar de AIA para la curva de calibración de AIA
Elaborado por: las autoras, 2019.

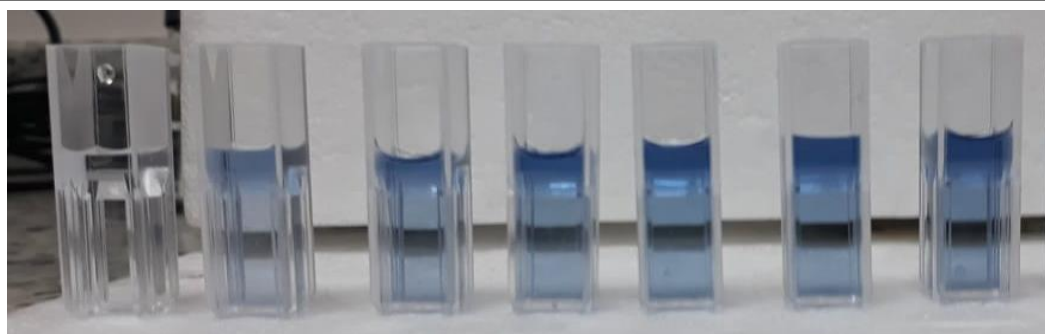


Figura 12. Soluciones estándar de fosfatos para la curva de calibración de fosfatos
Elaborado por: las autoras, 2019.

Anexo 6. Fase de campo



Figura 13. Siembra de semillas en bandejas de germinación
Elaborado por: las autoras, 2019.



Figura 14. Aplicación semanal de tratamientos mediante bomba de mochila.
Elaborado por: las autoras, 2019.

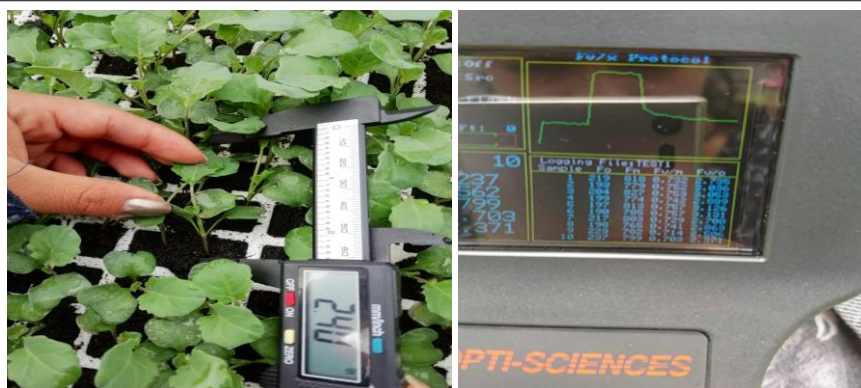


Figura 15. Toma de datos de longitud, grosor y eficiencia fotosintética
Elaborado por: las autoras, 2019.



Figura 16. Calculo del peso y longitud de las raíces de lechuga por cada tratamiento.
Elaborado por: las autoras, 2019.



Figura 17. Calculo del peso y longitud de las raíces de brócoli por cada tratamiento.
Elaborado por: las autoras, 2019.

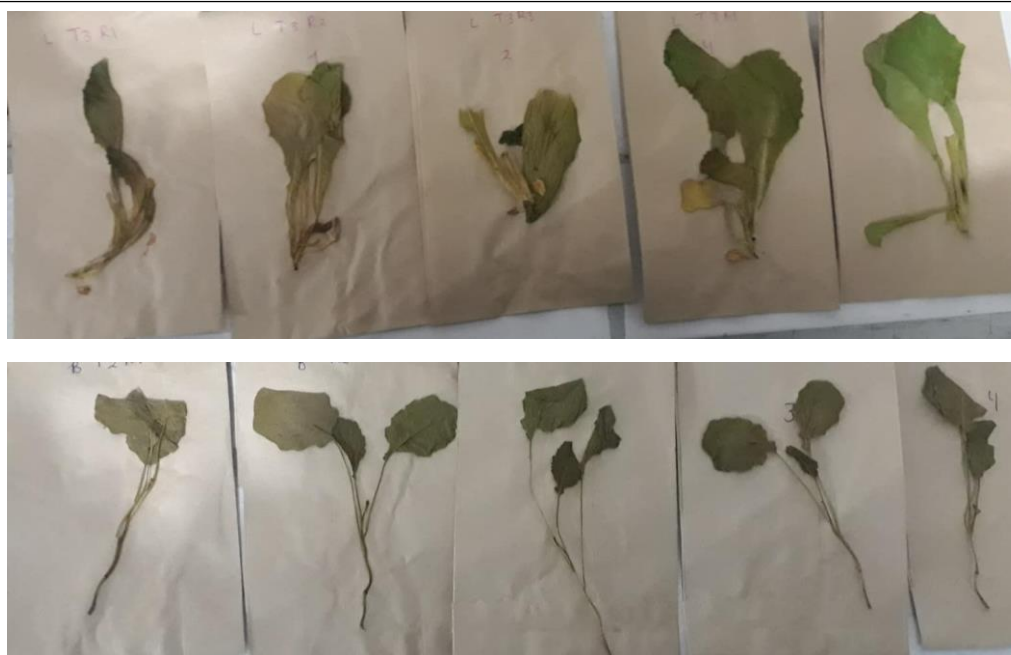


Figura 18. Calculo del peso de materia seca de lechuga y brócoli
Elaborado por: las autoras, 2019.